



LOWEY
y
SIEKEVITZ

ESTRUCTURA Y FUNCION CELULAR

SERIE MODERNA DE BIOLOGIA

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

ESTRUCTURA

Y

FUNCION

CELULAR

La cooperación armónica de todos
los seres surgió, no por ordenes de
una autoridad externa a ellos mismos,
sino al hecho de que todos
ellos son parte en una jerarquía
de conjuntos formando un modelo
cósmico y lo que obedece son los
dictados internos de su propia naturaleza.

Chuang, Tzu
(*Tercera Centuria A.C.*)

CONTENIDO

Prefacio

PARTE I. BIOLOGIA DE LA CÉLULA

1. EL DENOMINADOR COMÚN DE LA MATERIA VIVIENTE
2. LA VIDA Y LA SEGUNDA LEY DE LA TERMODINAMICA
3. LA HISTORIA NATURAL DE LA CÉLULA

PARTE II. ESTATICA BIOLÓGICA

4. LA VIDA Y LA TABLA PERIÓDICA
5. EL AGUA Y LA VIDA
6. LAS PEQUEÑAS MOLÉCULAS DE LA MÁQUINA VIVIENTE
7. LOS ÁCIDOS NUCLEICOS, PORTADORES DE INFORMACIÓN BIOLÓGICA
8. LAS PROTEINAS, AGENTES DE ESPECIFICIDAD BIOLOGICA

PARTE III. DINÁMICA BIOLÓGICA

9. LA CATALISIS DE ENZIMAS, MECANISMO DE CONTROL BIOLOGICO
10. CAMINOS METABÓLICOS.
11. EL MITOCONDRIO Y LA FIJACIÓN DE LA ENERGIA
12. EL NÚCLEO Y EL ALMACENAMIENTO Y TRANSMISIÓN DE INFORMACIÓN
13. EL RIBOSOMA Y EL USO DE LA INFORMACIÓN.
14. LA SUSTANCIA FUNDAMENTAL Y LA CONVERSIÓN DE LA ENERGIA QUIMICA EN TRABAJO.
15. EL SISTEMA DE LA MEMBRANA Y EL INTERCAMBIO DE MATERIALES.
16. DESARROLLO Y CONTROL DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN CELULAR

PREFACIO

La década pasada fue testigo de una acumulación explosiva de conocimientos profundos dentro de la maquinaria molecular de la célula.

Comenzamos a vislumbrar un modelo molecular que incluye fenómenos tales como la autoduplicación del material hereditario celular y el control que ejerce en la formación de las catálisis de la célula. La especificidad biológica, una propiedad tan característica del mundo viviente, está en relación con la estructura y la interacción de las macromoléculas. El microscopio electrónico creó repentinamente un nuevo mundo, rico e intrincado en detalles, el cual está siendo activamente interpretado en términos moleculares. La regulación de esta maquinaria celular tan complicada, está ahora examinándose en una forma tal, que dentro de muy poco tiempo, tendrá un rigor operativo.

Estos adelantos han dado por resultado la comprensión de que existe una relación intrincada entre la estructura y la función celulares. Las disciplinas más clásicas de citología, fisiología celular, bioquímica y biofísica se están fundiendo dentro de una estructura común que frecuentemente se refieren como la «biología celular de la célula».

El propósito de este libro es reunir todos estos extraordinarios adelantos y hacerles accesibles al estudiante que empieza. Tenemos la convicción de que, puesto que la célula es el «denominador común» de los sistemas vivientes, es sumamente importante que el principiante se familiarice con los principales hechos y teorías de la biología celular. Esta introducción servirá para un doble propósito: proveerá al estudiante de una base firme desde la cual pueda examinar los otros múltiples fenómenos de la vida del universo y también lo convencerá, desde que se inicia, de la importancia crucial de las ciencias físicas para el estudio de los sistemas vivientes.

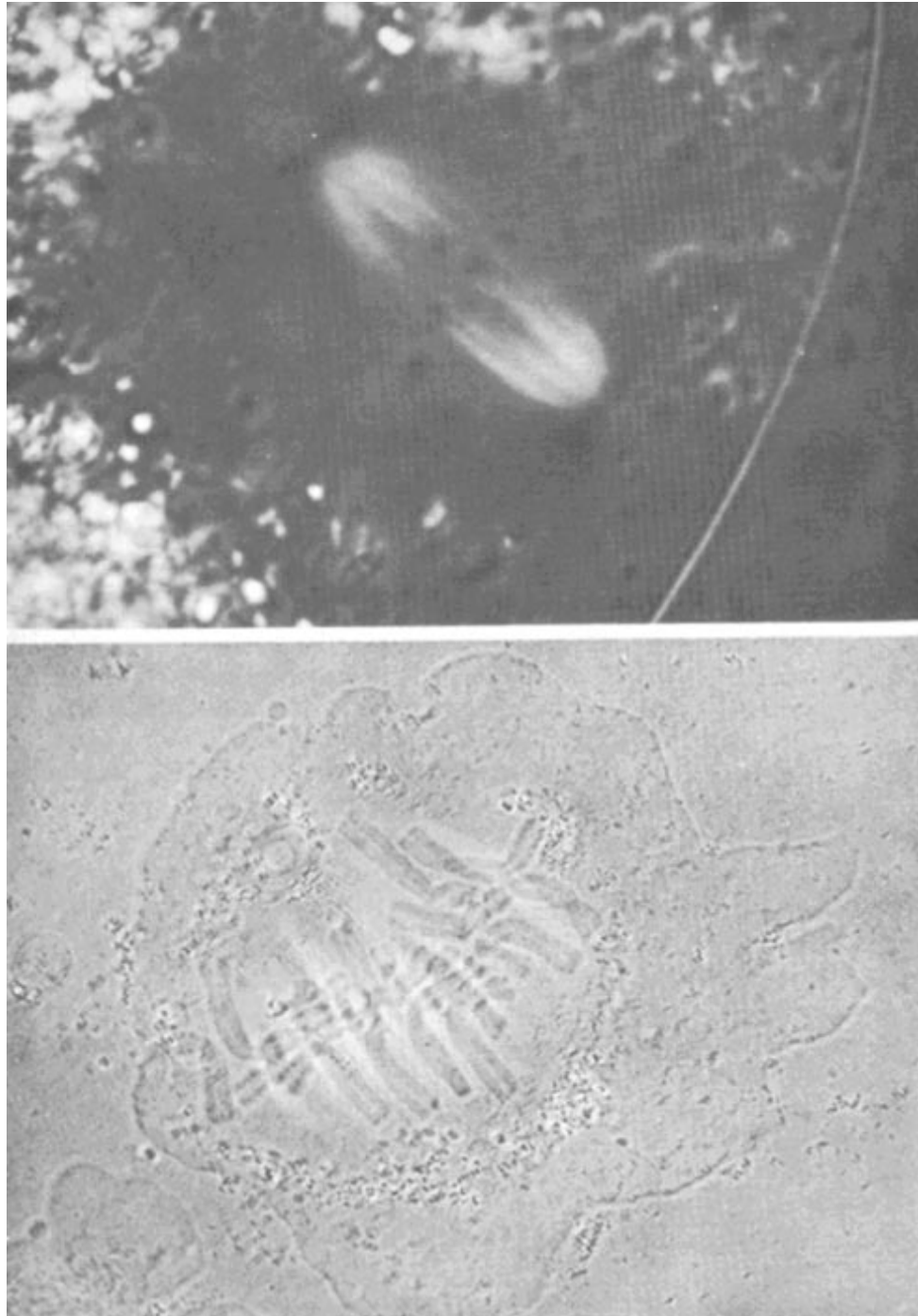
A causa de lo reducido de su tamaño, este libro omite tanto ciertos tópicos como trata a otros con inevitable brevedad. Sin embargo, el material contenido en las lecturas que se sugieren al final de los capítulos, ampliará considerablemente el alcance del texto mismo.

No fue intención de los autores hacer un libro elemental, en el sentido de limitarlo necesariamente a los aspectos más simples y accesibles de la biología celular. Aun así, esperamos que éste sea un libro para principiantes puesto que creemos que es precisamente el principiante el que necesita una visión actualizada de este campo de estudio.

A.G.L.
PoS.

P A R T E I

BIOLOGIA DE LA CELULA



Huso micótico como se observa con el microscopio de luz polarizada. Las fibras del huso que separan a los cromosomas se ven como rayas brillantes. *Arriba*: Oocito de un gusano marino, el *Chaetopterus pergamentaceous*. *Abajo*: Célula endospermica del fruto del lirio sanguíneo del Africa, el *Haemanthus katherinae*. Los pares de cromosomas se observan en el momento de la separación. (Fotografía cortesía e S. Inoué, Dartmouth Medical School y de *Chromosoma*)

CAPITULO UNO

EL DENOMINADOR COMUN DE LA MATERIA VIVIENTE

El estudio del mundo viviente es tan antiguo como el hombre porque la clasificación y comparación de la enorme cantidad de formas vivientes está íntimamente ligada a la supervivencia del hombre. Nuestros antepasados conocían las diferencias entre un murciélago y un pájaro mucho antes de saber que había una similitud entre los tejidos de una seta y del hombre.

El conocimiento de que todos los organismos comparten ciertos principios comunes se remonta hasta la teoría celular. Esta teoría, enunciada por Schleiden y Schwann en 1838, establecía que todos los organismos vivos están compuestos de células y de sus productos. En la actualidad este principio parece evidente, pero no debemos olvidar que durante mucho tiempo lo hemos considerado implícitamente conocido. Para los predecesores de Schleiden y Schwann, el concepto de que el organismo es la unidad fundamental de la actividad biológica era un principio fácilmente observable, bien establecido y comprensible. El hecho de que los organismos estén a su vez compuestos de subunidades más pequeñas, cada una de las cuales es un ente individual fue una revelación extraordinaria. Ciertamente, hasta donde la célula tiene una individualidad propia y una capacidad independiente de vivir no fue, de ninguna manera, una cosa clara aun para Schleiden y Schwann. Sólo, hasta últimamente, hemos comenzado a reconocer el grado en el cual, todas las células comparten un importante papel en los principios que llamamos la "maquinaria de la vida". Hemos aprendido que las células, ya sean protozoos o células del hígado humano, duplican su material genético de la misma forma, utilizan su poder hereditario para sintetizar proteínas de la misma manera, al igual que transfieren la energía, regulan el intercambio de materiales, convierten la energía química en trabajo y así todo lo demás. Es más, fue muy desconcertante para aquellos interesados en la diferenciación o en el problema del cáncer, que tan pocas diferencias fundamentales puedan ser descubiertas entre células de diversos tipos.

El propósito de este libro es describir las características comunes de la maquinaria celular, porque creemos que es el "módulo" básico, el común denominador, de todas las variedades de formas vivientes. Sin embargo, no debemos olvidar que todas las células desempeñan papeles determinados dentro de la diversidad de funciones y formas biológicas; la célula generalizada que vamos a describir es una abstracción

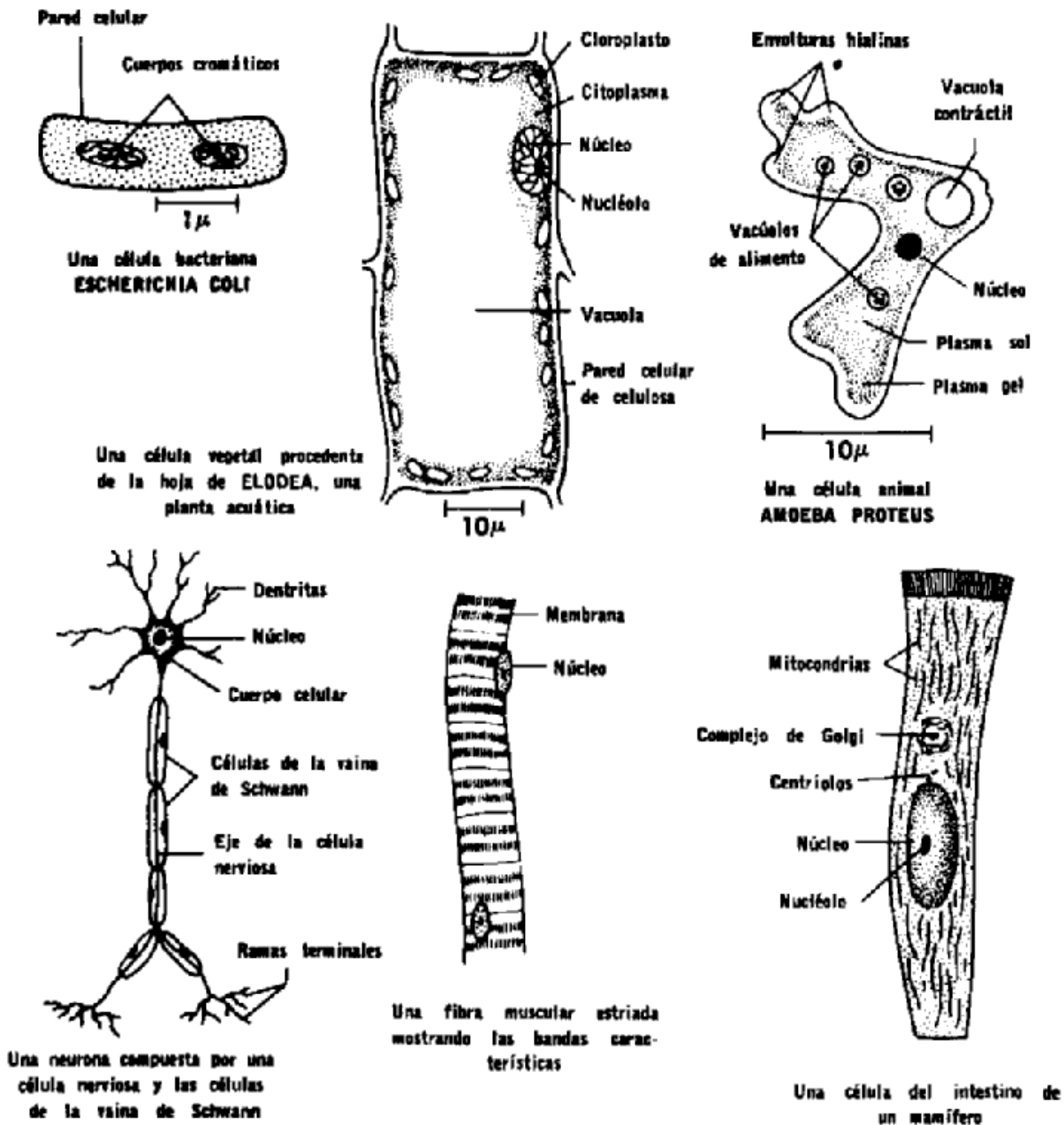


Fig. 1-1. Varios tipos de células encontrados en los reinos microbiano, vegetal y animal

que no existe en la naturaleza. En su lugar, se han encontrado células especiales adaptadas para funciones específicas (Fig. 1-1): los microorganismos unicelulares simples con su periodo de generación corto y su adaptación metabólica rápida; la célula vegetal con su vacuolo grande y su pared celulósica delgada manteniendo la rigidez estructural durante el equilibrio osmótico con el medio ambiente; y la célula animal, desnuda y frecuentemente móvil, capaz de ingerir grandes partículas de alimento. En cada uno de estos tres grandes reinos y aun en cada organismo dado hay muchos tipos de células diferentes. (Fig. 1-1). El cuerpo de los mamíferos, por ejemplo, posee células musculares estriadas, alargadas y fibrilares, células nerviosas delgadas y ramificadas y células intestinales metabólicamente activas. Estas y

muchas otras representan especializaciones que capacitan a las células a desempeñar sus papeles específicos. Dado el propósito de este libro, no incluye el tratamiento de estas funciones especializadas sino que ocasionalmente serán mencionadas. Sin embargo, es importante reconocer que muchas de estas funciones celulares especializadas se originan en fenómenos celulares generales que tienen lugar, en forma atenuada, en todo el mundo celular. La conducción nerviosa está basada en potenciales de acción que aparecen en todas las células. La contracción muscular se basa en un mecanismo de conversión de la energía química en trabajo, que parece ocurre universalmente. Por ejemplo, el trabajo osmótico encontrado en forma bastante activa en las células del riñón, también parece ser una propiedad universal de la materia viviente. De manera que si no existe una célula generalizada o arquetipo es conveniente crear una para que sirva como modelo conceptual y en éste se pueden incorporar y discutir la mayor parte de las funciones celulares.

Nuestro estudio de la célula arquetipo se basará, como la mayor parte de los enfoques experimentales de la biología, en la presuposición de que todos los fenómenos biológicos pueden analizarse en función de principios físicos y químicos. Esto, reconocidamente, es un acto de fe que no puede justificarse en terrenos *a priori*; aunque es un acto de fe eminentemente *útil* y representa la base filosófica de un acercamiento que está proporcionando resultados comunicables y que se pueden comprobar, de una significación cada vez más extendida y siempre con creciente rapidez. En verdad, el propósito de este libro es exponer el desarrollo explosivo del conocimiento molecular a la biología de la célula,

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

Bourne, G. H., 1962. *Division of labor in cells*. New York: Academic Press.
Brachet, J., "The living cell," *Scientific American*, September 1961.

CAPITULO DOS

LA VIDA Y LA SEGUNDA LEY DE LA TERMODINAMICA

Se ha estimado que hace entre dos y cuatro mil millones de años que la vida comenzó en nuestro planeta. Si ésta principió espontáneamente partiendo de materia no viviente o si vino a nuestro planeta de sistemas solares distantes, bajo la forma de esporas a través del universo, no lo sabemos. En cualquiera de los casos, debemos suponer que la vida empezó primeramente transformando materiales no vivientes en materia viva. Existen muchas especulaciones en años recientes sobre el mecanismo implicado en tal conocimiento tan notable.

Hemos dicho que la vida se formó de materia no viviente. Esto presupone que existe una diferencia entre estos dos estados de materia y es, por lo tanto, lógico preguntarse cuál es esa diferencia. No es posible dar una definición completa de materia viviente puesto que esto implica un conocimiento y entendimiento totales de la misma. No obstante, puesto que por regla general estamos capacitados para distinguir entre “animal”, “vegetal” y “mineral”, es lógico preguntarnos sobre qué criterio se han basado tales juicios. ¿Existe unicidad de criterios sobre la materia viviente? Generalmente, contestamos esta pregunta enumerando una serie de características que asociamos a la materia viviente, tales como movimiento, reproducción, metabolismo, sensibilidad, crecimiento, etc. Se admite comúnmente que cada una de estas propiedades se pueden encontrar en el mundo no viviente, pero se arguye que en la materia viviente se hallan presentes simultáneamente y en su grado más complejo de expresión. Así, es verdad que se puede reproducir el trabajo de las locomotoras, el pensamiento de las computadoras y algunas máquinas automáticas. Hasta ahora no poseemos computadoras que caven zanjas, se reproduzcan, encuentren placer en la poesía y hagan juicios morales. Pero, si consideramos que la materia viviente está sujeta a las leyes de la química y de la física, entonces debemos aceptar la posibilidad de que tales monstruos puedan, en principio, ser contruidos. ¿Concluiremos entonces que no hay necesidad de que exista una diferencia esencial entre el hombre y el monstruo? Pensamos que si, pero con una condición crucial: los orígenes históricos del hombre y del monstruo son diferentes. El hombre contruyó al monstruo y no el monstruo al hombre. Entonces nosotros presentamos un criterio de materia viviente de carácter histórico. La vida es un proceso que partió de un nivel poco complicado, el cual se hizo espontáneamente más complejo durante un proceso que llamamos evolución. Este proceso ha tomado mucho tiempo y encuentra su expresión actual más compleja en la forma del *Homo sapiens*. La organización anteriormente mencionada y siempre en expansión, está

siendo, al presente, más profundizada por el *homo sapiens* a su mundo físico, de manera que las diferentes formas de organización, tanto concretas (edificios, máquinas, etc.) como abstractas (conocimiento, percepción y aun la sabiduría), se van acumulando a velocidad creciente. Si esta nueva forma de organización extraorganísmica que llamamos civilización establece evolutivamente, llevando a descubrimientos nunca soñados en la evolución social del hombre o si está influida con las contradicciones biológicamente enraizadas incapaces de solución en un nivel social, solamente el futuro lo dirá.

A pesar de las grandes hazañas recientes en la construcción de complicadísimos aparatos mecánicos, capaces de efectuar muchas manipulaciones hasta ahora restringidas a la materia viviente, no debemos menospreciar la intrincada organización de los sistemas vivientes. La escala casi infinitamente pequeña en la cual la organización biológica es capaz de ser reducida, es una de las más asombrosas maravillas de la naturaleza. Uno solamente necesita comparar las monstruosas computadoras electrónicas accionadas por megawatios de energía con el infinitamente más sofisticado cerebro humano accionado con sólo microwatios de energía, para reconocer la notable economía espacial y energética con que trabajan los sistemas biológicos. El hecho de que el esperma humano sea capaz de llevar en su diminuto volumen, la mitad de todas las determinantes genéticas de los individuos maduros, es otro ejemplo del grado de microminiaturización que lleva a cabo la materia viviente. Nuestros ingenieros deben aprender aún estos trucos fundamentales de la naturaleza.

Hemos dicho hasta ahora, que las características fundamentales del mundo viviente son la evolución, la conservación y la extensión de un grado tremendo de organización, capaces de ser colocados dentro de pequeñísimos volúmenes. ¿Es este proceso de organización, conservación y extensión una propiedad única de la materia viviente? La Segunda Ley de la Termodinámica, que es una ley fundamental del universo físico, establece que los sistemas aislados, espontáneamente tienden hacia estados de mayor desorganización. A primera vista aparece como si la Segunda Ley no fuera obedecida por la materia viviente y, en verdad, esto fue lo que sospechó G. N. Lewis, uno de los creadores de la termodinámica. Sin embargo, a fin de examinar este problema más cuidadosamente, debemos hacer un enunciado más preciso de la Segunda Ley de la Termodinámica. El grado de desorganización, o entropía, de un sistema, no es la única propiedad implicada en un proceso espontáneo. La "energía libre" es un parámetro importante y se puede definir como la "energía capaz de realizar trabajo". Un proceso solamente puede continuar espontáneamente cuando hay una pérdida de energía libre. En un sistema aislado, a temperatura constante, el cambio en la energía libre y el cambio en entropía están en relación, el uno con el otro, por medio de la siguiente ecuación:

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S$$

en donde

ΔF es el cambio en energía libre

ΔH es el cambio en el contenido de calor o entalpía

T es la temperatura absoluta

ΔS es el cambio en la entropía

Aunque la Segunda Ley de la Termodinámica empezó como una generalización empírica, ha sido posible desde entonces, explicarla, aplicando métodos estadísticos de análisis a las partículas de que se compone la materia.

Aunque la Segunda Ley predice que un sistema cuando se abandona a si mismo, tenderá a decrecer su estado de organización, permite, sin embargo, un aumento de ella cuando se le proporciona energía libre al sistema. Y esto parece que es lo que ocurre en el caso de la materia viviente. El elevado contenido de energía libre y el bajo estado de desorganización de la materia viviente se conservan, y algunas veces se aumentan más, por medio de un constante abastecimiento de energía libre. Tan pronto como ese abastecimiento se suspende, los sistemas vivientes prosiguen espontáneamente hacia un estado de mayor desorganización (la muerte). Este tipo de sistema lábil que se conserva a cierto nivel de organización por medio de un continuo abastecimiento de energía libre, se describe frecuentemente como estado estacionario. No representa un equilibrio en el cual el sistema ha ganado la más baja energía libre posible y la más elevada desorganización posible. De hecho, un estado estacionario es un sistema fuera de equilibrio que solamente se puede conservar en su aparente estabilidad por medio de un suministro continuo de energía libre. Un modelo físico de tal género, sería un baño de agua, regulada térmicamente, conservada a una temperatura constante, diferente a la de sus alrededores. Aquí, otra vez el modelo físico sería diferente al equivalente viviente (esto es, en lo que se refiere a la regulación de la temperatura de los mamíferos) primordialmente por su origen histórico. Después de todo, nosotros somos los que construimos el baño de temperatura constante.

El suministro constante de energía libre es sólo uno de los requisitos para la conservación de un estado estacionario. Debe existir, asimismo, una organización mínima capaz de absorber y canalizar la energía para su mejor aprovechamiento. Como biólogos, nosotros creemos que en el caso de la historia de los seres vivientes, esta organización ha aparecido bajo la forma de hechos fortuitos, ligados unos a otros, en una progresión de constante aumento de complejidad, por medio del fenómeno de la selección natural. **Nosotros creemos que este fenómeno de evolución repentina no viola la Segunda Ley de la Termodinámica, puesto que estuvo "reforzado" por un abastecimiento continuo y generoso de energía libre que tuvo su origen en las reacciones atómicas del sol.** Con la aparición de la inteligencia humana, la evolución de diversos tipos de organización ya sea ésta una biblioteca, una teoría científica, o una computadora no se puede considerar por más tiempo como hecha al azar, como se cree que se verifican las mutaciones genéticas,

aunque en éstas también son válidos los principios generales; a saber, que la energía libre es necesaria para permitir la elaboración de estos productos de la imaginación humana.

Hace cinco mil millones de años, antes de que apareciera la vida en nuestro planeta, toda la energía libre vertida sobre él, procedente del Sol, era rápidamente disipada como calor inútil y radiada al espacio exterior. Entonces se formaron diminutos sistemas, capaces de atrapar algo de esta energía libre, la cual fue utilizada para conservar y aumentar la organización de estos sistemas. A medida que progresó la evolución, este proceso se hizo más eficiente y de mayor extensión. En la actualidad, los rayos recogidos del Sol constituyen la fuente de abastecimiento de energía libre que sirve para construir ciudades o para volver la materia viviente en si misma, en la investigación de los principios por los cuales es gobernada. El estado estacionario de la vida ha adquirido algo de la energía libre del Sol y la está reteniendo bajo la forma de "biosfera" siempre creciente.

Existe una Tercera Ley de la Termodinámica que establece que, en el cero absoluto, la entropía de toda sustancia es cero. Quizá pudiéramos enunciar una "cuarta ley" que estableciera que, dando el tiempo suficiente, los bloques atómicos de construcción necesarios, la temperatura adecuada y un constante abastecimiento de energía libre posiblemente fluctuando en un ciclo diurno, se desarrollaría, por necesidad, un "bios" de creciente complejidad, que tendería el efecto total de disminuir la velocidad en la cual la energía libre comienza a degradarse. Los puntos de vista comúnmente sostenidos por los astrónomos de que los soles del universo están, probablemente, acompañados por planetas, de los cuales un número finito serían semejantes al planeta Tierra, nos llevan a la convicción de que no estamos solos en el Universo. Ya no pensaremos más en la evolución como "una gran coincidencia" de la naturaleza sino como una ley, en todo el sentido de la palabra.

Concluamos, la materia viviente no está fuera del mundo físico sino que es una parte integrante de él. Es un caso especial fascinante de la materia física que se distingue por la larga y característica historia de su desarrollo.

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

BLUM, H. F., 1955. Time's arrow and evolution. Princeton, N.J.: Princeton University Press.

OPARIN, A. I., 1961. Life, its nature, origin and development. New York: Academic Press.

PENROSE, L. S., "Sel-reproducing machines", *Scientific American*, June 1959.

UREY, H., "The origin of the earth," *Scientific American*, October 1952.

WALD, G., "The origin of life," *Scientific American*, August 1956.

CAPITULO TRES

LA HISTORIA NATURAL DE LA CELULA

La célula es la unidad biológica de la actividad. Aunque es divisible en partículas subcelulares que conservan algunas de las propiedades de la unidad funcionante original, la célula representa, no obstante, una unidad mínima de actividad relativamente independiente. Es la porción más pequeña del organismo que exhibe el conjunto de propiedades que nosotros hemos asociado con la materia viviente. En este capítulo, trataremos con ese conjunto de propiedades, a fin de dar al lector una semblanza de la "personalidad" de la célula.

TAMAÑO Y FORMA DE LA CELULA

En el mundo de las matemáticas, una ecuación permanece inalterable si ambos miembros de ella se aumentan en la misma proporción. Esto no es verdad en el mundo físico, en donde las relaciones entre los objetos están demasiado influidas por sus dimensiones absolutas. Es claro que el mundo en expansión y en contracción de la Alicia de Lewis Carroll, es el producto de la imaginación de un matemático, no el de un físico o de un biólogo. Uno de los primeros investigadores del tamaño y forma de las células en los sistemas biológicos, fue el biólogo británico D'Arcy Thompson, quien señaló, por ejemplo, que un elefante que pesara el doble, debería ser soportado por huesos de las piernas que tuvieran una área transversal cuatro veces mayor. A pesar del libro de D'Arcy Thompson, interesante y ampliamente leído, los biólogos, en conjunto, han sido tardos en reconocer la importancia de las dimensiones absolutas. Y todavía el mundo de la vida cae en un ámbito de tamaño que, desde un punto de vista cósmico, está restringido a una angosta banda de magnitud. La Fig. 3-1 es una síntesis de las relaciones de tamaño observado en un nivel cósmico, biológico y atómico.

Así, por ejemplo, la célula más grande es mayor que el mamífero más pequeño, el virus más grande, mayor que la célula más pequeña, y la macromolécula más grande, es mayor que el virus más pequeño.

Ilustra el hecho de que los sistemas biológicos caen dentro de ámbitos de tamaños definidos y superpuestos.

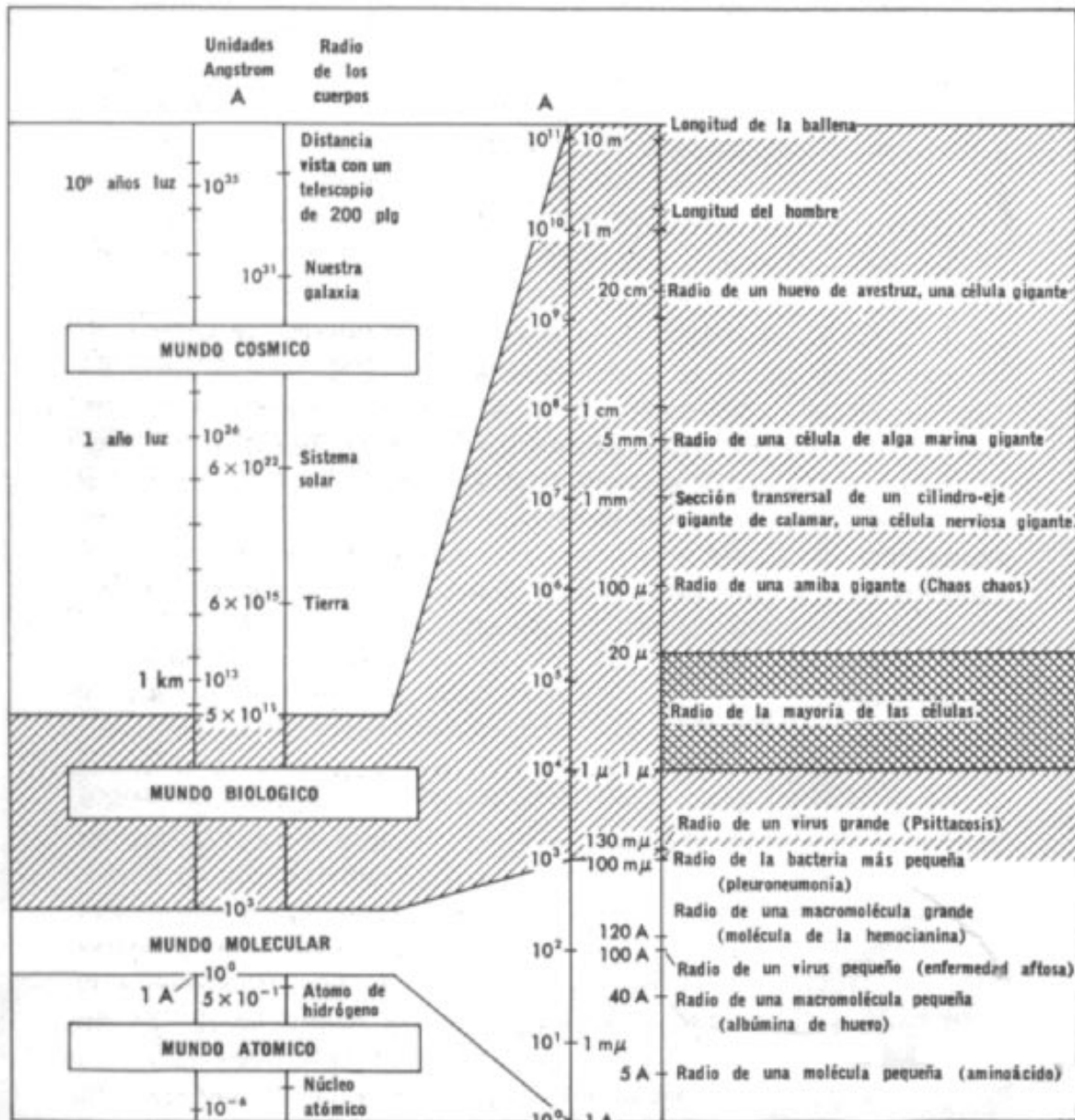


Fig. 3-1. Relaciones de tamaños en los niveles atómicos, molecular, biológico y cósmico

Si las células caen dentro de cierto ámbito de tamaño, ¿cuáles son las leyes que gobiernan este hecho? Nosotros, por conveniencia, definiremos a una célula como una unidad de actividad biológica, delimitada por una membrana semi-impermeable y capaz de autorreproducirse en un medio libre de otros sistemas vivos. A un virus lo definiremos como una unidad biológica autorreproducible que carece de una membrana semi-impermeable definida y que es capaz de autorreproducirse solamente dentro de una célula viva.

Las células vivientes más pequeñas se encuentran entre las bacterias. Se han observado especies tan pequeñas como esferas, que tienen 250 mμ de diámetro. (1000 micras [μ] = 1 milímetro [mm]; 1000 milimicras [mμ] = 1Λ.) Se han observado organismos como el de la pleuroneumonia, llamados "corpúsculos elementales" con diámetros de 100 mμ. Parecen ser formas en reposo de la bacteria, que pueden desarrollarse dentro de cuerpos de 250 mμ de diámetro durante el metabolismo activo del organismo. Parece ser que 200 a 250 mμ de diámetro, es el límite más bajo de tamaño para una célula viviente en actividad. El límite más bajo se puede establecer por el número mínimo y el tamaño de los componentes necesarios para una existencia celular independiente. El volumen de una célula de 200 mμ de diámetro será de $4 \times 10^6 \text{ m}\mu^3$ aproximadamente. Suponiendo que el 80% de la célula es agua, ésta deja un "volumen seco" de $8 \times 10^5 \text{ m}\mu^3$. Suponiendo un diámetro promedio de 10 mμ, obtenemos un volumen promedio por macromolécula de $5 \times 10^2 \text{ m}\mu^3$. Ignorando el volumen de los demás componentes principales de la célula, aparte de las proteínas y los ácidos nucleicos, y dividiendo el volumen promedio de las macromoléculas por el volumen seco de la célula, encontramos que existe un espacio solamente para 1600 macromoléculas. Suponiendo que existe un mínimo de 500 reacciones metabólicas necesarias para una existencia independiente, y que cada paso implica la presencia de una macromolécula de ácido desoxirribonucleico, ADN (gen), una de ácido ribonucleico, ARN (mensajero) y una de proteína (enzima), aparecería que en estas células más pequeñas existe lugar solamente para una o dos de cada una de las macromoléculas necesarias. Esta es una conclusión interesante, porque ilustra el hecho de que la célula es capaz de comportarse en una forma que se puede predecir y reproducir, utilizando macromoléculas, cada una de las cuales se encuentra presente en una cantidad "no estadística".

Los problemas que afectan el límite superior del tamaño de las células son muy diferentes. Antes que todo, se debe reconocer que, aunque la gran mayoría de las células queda en el rango de 0.5 a 20μ de diámetro, hay algunas células verdaderamente gigantes, cuya existencia está relacionada con ciertas circunstancias biológicas muy especiales. Las condiciones que afectan el límite superior en el tamaño de las células parece que están relacionadas entre si. Primero, existe una relación entre el núcleo y el resto de la célula. Como veremos más adelante, hay fundamento para aseverar que el núcleo emite ciertos "mensajeros" que determinan la síntesis de las proteínas de la célula. Claramente esto determinará la cantidad de citoplasma que determinado núcleo puede "controlar". Algunas células, sin embargo, sobrepasan este límite por tener varios núcleos, como sucede en las células gigantes de la ameba *Chaos chaos* o en el alga verde *Nitella*. Segundo, existe una relación entre las diferentes partes de la célula. Cuanto más grande sea la célula, mayor será el problema de la difusión. En las células multinucleadas grandes como las de la *Nitella* o en los *mohos* mucosos, este problema se resuelve por una muy activa forma de corriente citoplasmática. Tercero, existe una relación entre la

célula y su medio ambiente. La membrana del protoplasma es una cubierta extremadamente impermeable. Cuanto más grande sea la célula, la relación entre volumen superficie será menor. Este factor tiene una tendencia para aislar a la célula de su medio ambiente, situación que la célula vence, algunas veces, por medio de diversas modificaciones anatómicas. El aumento del área superficial por medio de una extensa invaginación, es una de las estrategias. Otro carácter anatómico distintivo, encontrado en las células nerviosas, que pueden tener varios pies de longitud, en los animales más grandes, es el desarrollo de una geometría en forma de hilos. En un hilo, largo y delgado, el aumento del área superficial permanece proporcional al volumen, y así, el grado de contacto entre la célula y su medio ambiente, no se reduce.

Se puede ver por lo expuesto anteriormente, que la forma de la célula está en íntima relación con su función. Esta relación por sí misma es un tópico de grandes proporciones de la biología celular comparada y está más allá del alcance de este volumen.

FUNCION DE LA CELULA

Un sistema viviente es un lugar de funcionamiento. Que este funcionamiento tiene una base estructural, es un principio que se considera como tema central de este libro. Pero en última instancia, es el funcionamiento de las unidades de la vida el que mejor caracteriza su naturaleza, y es por lo tanto más conveniente que empecemos nuestra descripción de la anatomía celular con una descripción muy generalizada de la función de la célula.

Como dijimos en el capítulo anterior, la materia viviente representa un grado elevado de organización (baja entropía) conservado en una condición de estado constante y lábil, por medio de un abastecimiento continuo de energía libre. Al mismo tiempo (y esto debe ser el aspecto fundamental de tales sistemas), se necesita una organización compleja para conducir energía por canales útiles para el mantenimiento de la organización. Así, la energía es necesaria para el mantenimiento de la organización, y ésta es necesaria para la utilización apropiada de la energía.

La Fig. 3-2 es un diagrama de flujo que sintetiza, en términos muy generales, las diversas transformaciones de la energía verificadas por la célula. Se aprecia que las plantas y los animales se asemejan mucho entre sí, excepto en lo que respecta a la fuente primaria de energía, de la cual ellos deben depender. La planta utiliza la energía de la luz para fabricar carbohidratos, grasas y proteínas, en tanto que el animal ingiere estas sustancias como alimentos. Los carbohidratos, grasas y proteínas no son los combustibles inmediatos que echan a funcionar a la maquinaria de la célula; en su lugar, el TFA (trifosfato de adenosina) realiza esta función. La energía liberada por el metabolismo respiratorio de la célula, durante el cual, los carbohidratos, grasas y proteínas, son descompuestos en bióxido de carbono, agua y

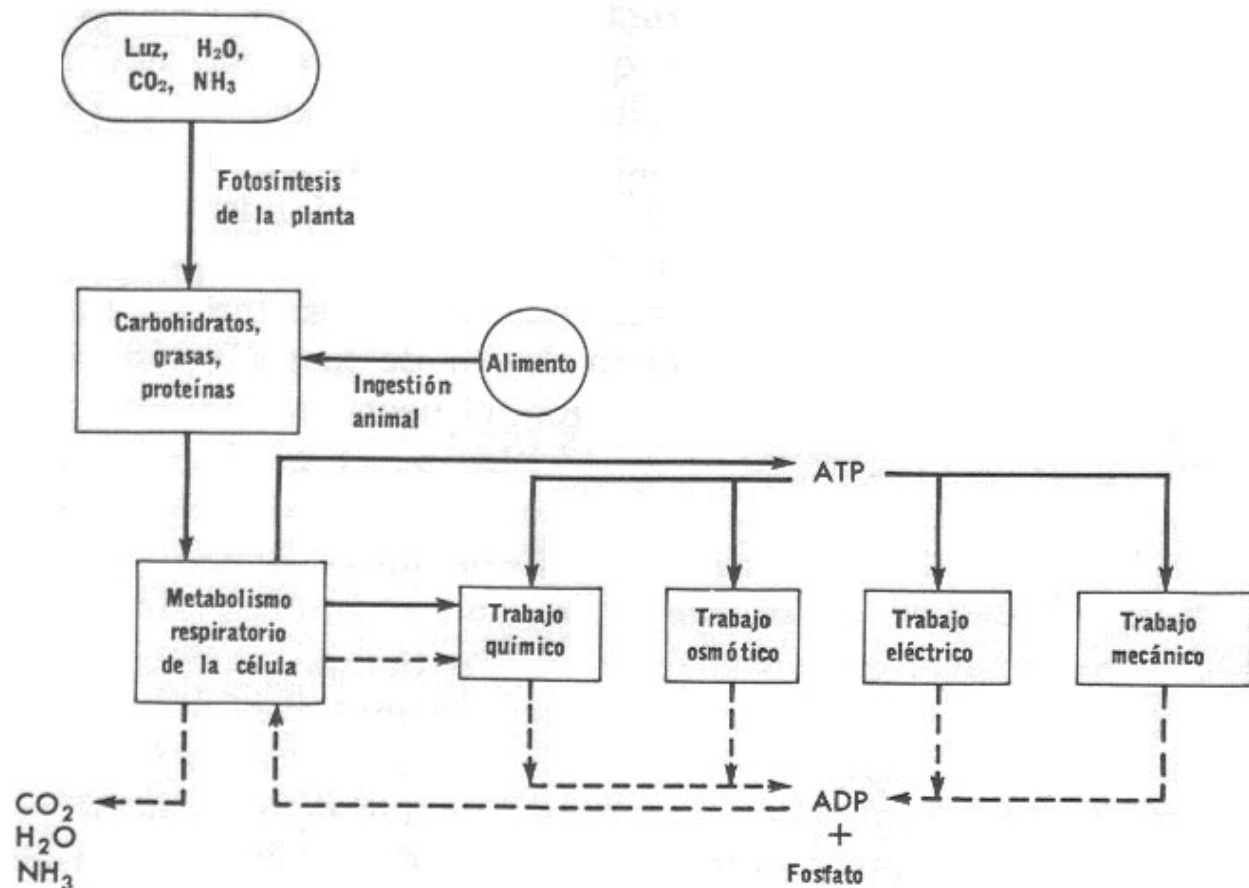


Fig. 3-2. El flujo de energía a través de los sistemas vivos. Las líneas llenas se refieren al contenido de "alta energía" y las punteadas al de baja energía

amoníaco, es utilizada en diferentes etapas para convertir el DFA (difosfato de adenosina) en TFA (véase el Cap. II).

Para resumir, los carbohidratos, las grasas y las proteínas son los "combustibles crudos" empleados para producir el combustible de "alto grado" TFA, el que echa a funcionar a toda la maquinaria de la célula. ¿Cuál es esta maquinaria de la célula y qué función realiza?

Trabajo químico (véanse los Caps. 13 y 14)

La maquinaria que hemos considerado en la Fig. 3-2 como la que verifica el trabajo químico está, en realidad, compuesta de muchas máquinas separadas, algunas de las cuales comenzamos a comprender.

A diferencia de las máquinas que construimos, la célula tiene que verificar la combustión de los carbohidratos, grasas y proteínas en una matriz estructural compuesta de los mismos materiales. Así, la célula tiene que reemplazar constantemente a los componentes que se han alterado durante su función. Además, una de las características de la vida es que la materia viviente siempre se extiende a

sí misma. La célula no solamente se repara se extiende así misma. La célula no solamente se repara a sí misma sino que también se duplica (véase Cap. 12). No sabemos si esto es una necesidad fisiológica o una consecuencia evolutiva de la selección natural, pero cualquiera que sea su origen, el hecho es que una gran cantidad de energía que fluye dentro de la célula se utiliza para el crecimiento y duplicación de la célula. El concepto de **material hereditario** es necesario para comprender cómo la célula lleva a cabo estas funciones vitales.

Se ha reconocido desde hace tiempo que la célula ni construye todo sus componentes de una "zarpazo". Cierta proporción de su organización estructural se conserva de generación en generación. Esta porción del material de la célula es lo que se denomina *material hereditario* y se caracteriza por el hecho de que está implicada en su propia síntesis (véase Cap. 12). Sin embargo, el material hereditario no serviría de nada, si ésta fuera su única función. Además está el papel de autoduplicación inicia también las funciones fisiológicas que verifica la célula. Una gran proporción de la entropía negativa (organización) de la célula, se localiza en el material hereditario y la célula tiene que gastar energía tanto en duplicación como para llevar a cabo su misión con respecto a la función fisiológica como de crecimiento.

Trabajo osmótico (véase el Cap. 15)

Ya hemos dicho que el material viviente difiere mucho de su medio ambiente, en su relativa abundancia y también en la concentración absoluta de sus partes componentes. Para obtener y mantener esta situación, la célula debe realizar trabajo osmótico. Debe hacerlo tanto para acumular materiales que se encuentran en bajas concentraciones en el medio ambiente, como también arrojar a su seno aquéllos que se hallan en elevada concentración en el medio que la rodea. Pero no sólo esta acumulación y eliminación de materiales requiere trabajo, sino también lo necesita la *conservación* de esta poco probable situación termodinámica. En fin, este proceso de conservación sería imposible en términos de energía, si no fuera por la presencia de la membrana plasmática, la cual, creando una barrera extremadamente sólida a la difusión, le ahorra a la célula gran cantidad de energía.

Trabajo eléctrico (véase el Cap. 15)

La membrana plasmática de la célula, nunca es igualmente permeable a cationes y aniones específicos; tampoco se pueden acumular en la misma proporción. Por estas razones, todas las células deben ejecutar una ligera separación de carga a través de su membrana, dejando la exterior positiva con respecto a la interior o viceversa. Esta diferencia eléctrica se utiliza en las células nerviosas para la comunicación, por medio de la transmisión de un impulso eléctrico, bajo la forma de una ruptura en la separación de carga. Esta actividad, como cualquier otra forma de trabajo, necesita energía.

Trabajo mecánico (véase el Cap. 14)

Toda la vida está conectada con alguna forma de movimiento ya sea la contracción de las células musculares, el batir de los cilios, el fluir de la ameba, la ciclosis del protoplasma en una célula vegetal o el movimiento de los cromosomas. El movimiento requiere energía que debe penetrar en una máquina para convertir la energía química en trabajo.

Además, de estas cuatro categorías generales de actividad que requieren energía, las células pueden invertir en otras diversas funciones que no son tan comunes. Las células interaccionan y se influyen entre sí en el desarrollo y crecimiento de un organismo como también en el funcionamiento fisiológico de los sistemas pluricelulares. ¡ Algunas células hasta producen luz ! Desde el punto de vista evolucionista, quizás el descubrimiento reciente más significativo en la termodinámica de la vida es que algo de la organización de la célula es transportado al exterior de los límites celulares; esto es, los sistemas vivos pueden utilizar energía para organizar su medio ambiente. Esta fase social de la evolución biológica tiene lugar más extensamente en los niveles de organismo y de población, siendo más evidente en las actividades humanas.

LA ANATOMIA FUNCIONAL DE LA CELULA

Vivimos en el centro de una revolución, en lo que se refiere a la anatomía de la célula - una revolución ocasionada por el microscopio electrónico, el cual nos ha dado, francamente, un nuevo aspecto de la célula, amplio en visión y rico en detalles (Fig., 3-3 y 3-4): Una breve descripción de este valioso instrumento es digna de hacerse aquí. La visualización de un objeto depende de la onda electromagnética particular que se utilice. Para que un objeto pueda ser visto, debe absorber y reflejar ondas electromagnéticas de longitudes de onda no mayores que dos veces el diámetro del objeto. Esto determina el *poder resolutivo* del microscopio, el cual se define como la distancia más corta entre dos puntos, que permite observarlos como entidades separadas. El poder resolutivo del microscopio de luz es aproximadamente 250 mμ, ya que el límite más bajo de la luz visible es de más o menos 500 mμ. En el microscopio de luz ultravioleta se puede disminuir el límite de resolución a 80 mμ aproximadamente. El microscopio electrónico utiliza un rayo de electrones con una longitud de onda menor de un Angstrom (Å; 0,1 mμ) en lugar de luz. En lugar de vidrio, emplea campos electromagnéticos como lentes y condensadores, capaces de refractar el rayo de electrones, casi en la misma forma que lo hace el clásico microscopio de luz con el rayo luminoso. En lugar de la retina del ojo, el microscopio electrónico produce una imagen en una pantalla fluorescente o en una placa fotográfica. Aunque el poder resolutivo teórico del ME es menor que 1 Å, los problemas de ingeniería que se presentan en la producción de unidades convenientes son enormes y solo una resolución de 6 a 8 Å se ha conseguido con muy poca frecuencia. Por otro lado, la resolución de 20 a 40 Å se puede obtener con bastante

facilidad. La principal desventaja del ME, el cuál aumenta el poder resolutivo unas 100 veces más que el microscopio de luz, es que los especímenes deben ser de "hueso seco" y ultradelgados. Por lo tanto, podemos decir que nosotros sólo vemos "perfiles" de estructuras que carecen completamente de vida. Volvemos a crear en nuestras mentes una imagen de la estructuras reales, por medio de la integración de los perfiles.

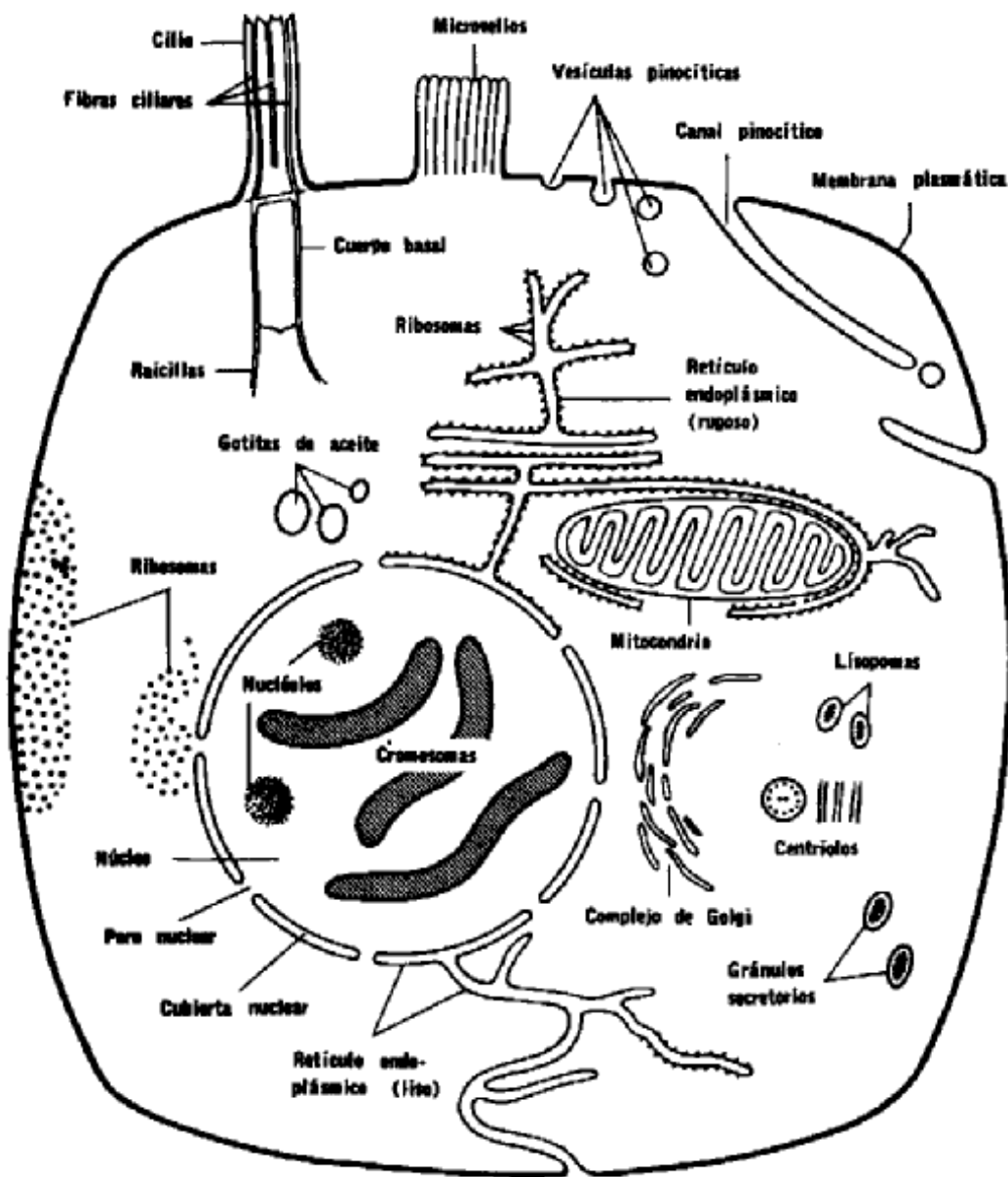


Fig. 3-3. Diagrama estilizado de una "célula típica", tal como se ve con un microscopio electrónico. Las diversas estructuras no se encuentran en todas las células, pero ilustran las diferenciaciones que tienen lugar entre los tipos de células.

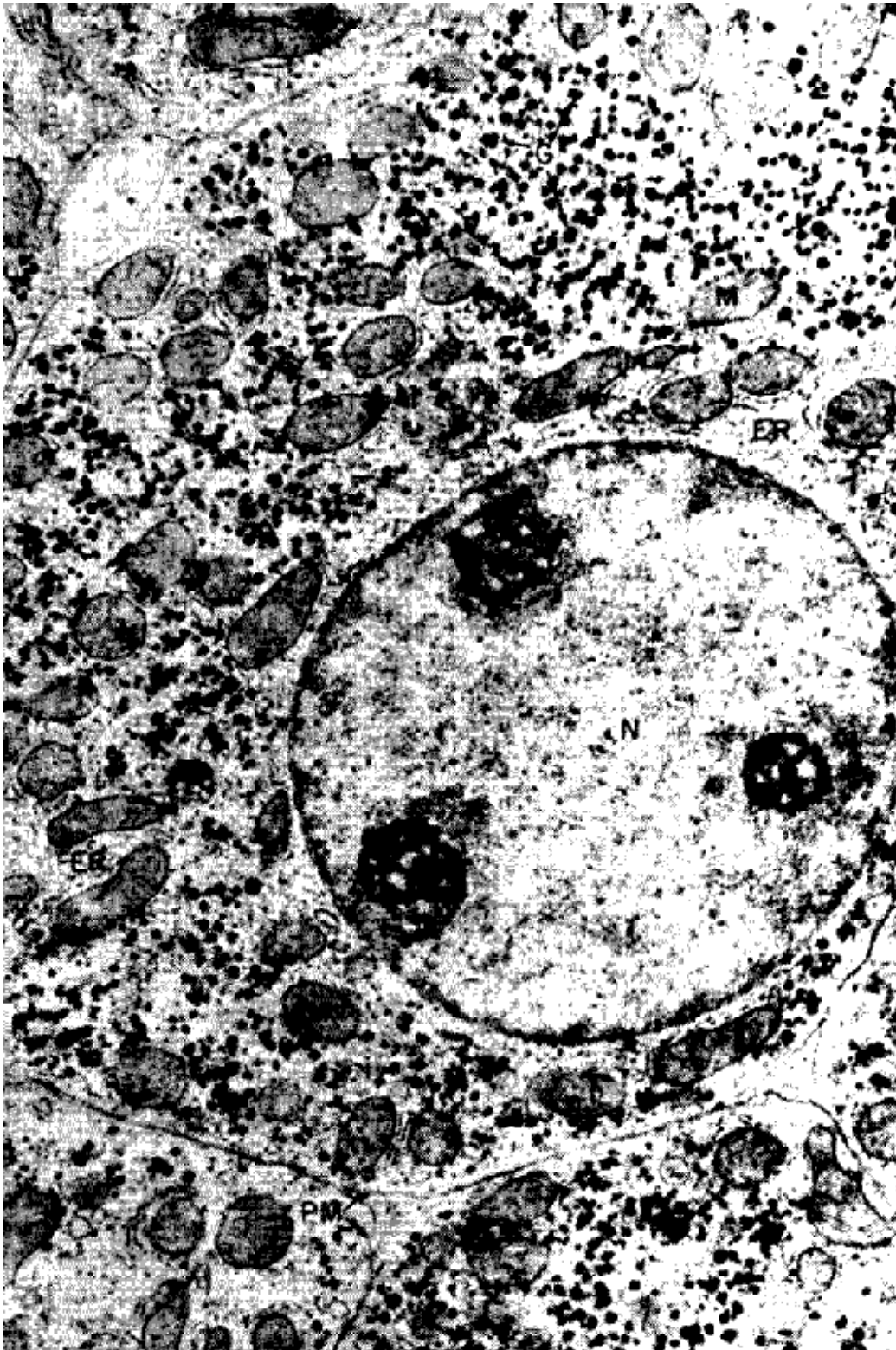


Fig. 3-4. Célula colocada bajo el microscopio electrónico (X 19 500). Una microfotografía electrónica de una célula hepática mostrando el núcleo (N), con tres nucleolos (n), mitocondrios (M), perfiles del retículo endoplasmático (ER), la zona de Golgi (g), depósitos de glucógeno (G) y la membrana plasmática (PM). (Cortesía de G. Palade. Rockefeller Insitute)

Cual es, entonces, el aspecto presente de la anatomía de la célula ya que se ha extendido y modificado profundamente por medio de la aplicación de técnicas recientes?

La superficie de la célula está delimitada por una "piel" precisa y muy rigurosamente definida. Como veremos en el Cap. 15, ésta es la membrana plasmática, osmóticamente activa, la cual es capaz de disminuir la velocidad de penetración de las moléculas, así como de hacer una distinción entre ellas.

Sospechamos que la membrana plasmática posee regiones activas catalíticamente y que la energía utilizada en esta maquinaria para efectuar el trabajo osmótico, también se encuentra localizada ahí. La membrana plasmática es aproximadamente de 75 Å de grueso y parece que está compuesta de tres capas separadas (Fig. 15-1). Antes del advenimiento del microscopio electrónico creíamos que la membrana plasmática se encontraba muy estirada sobre toda la célula. Ahora sabemos que esto no es, seguramente lo que acontece. La superficie de la célula se dobla ya sea hacia afuera para formar microvellos, o se invagina dando lugar a vesículas (Fig. 3-5). Estas y otras modificaciones de la superficie celular están íntimamente relacionadas con condiciones osmóticas particulares de la célula en las cuales ellas se han encontrado. Uno tiene la impresión de que la membrana del plasma es una estructura estándar, razonablemente invariable al nivel molecular y que se adapta por si misma, a las variaciones de la función celular por medio de modificaciones en su anatomía. Como veremos en el Cap. 15, frecuentemente las invaginaciones observadas en la superficie de la célula parece que dan lugar, por medio de un movimiento hacia adentro de la membrana del plasma, a algunas de los *vacuolos* que se observan en el interior de la célula (Figs. 3-5 y 15-6). Este método de ingerir líquido atrapado dentro de las vesículas se denomina pinocitosis (Cap. 15).

Si uno explora la superficie celular con mayor detalle, descubre que algunas de las invaginaciones no están limitadas por vesículas sino que conducen directamente al interior de la célula (Fig. 15-6). Ahí, unos canales se unen a un complejo con junto de vesículas que entrelazan la estructura de la célula y se denomina retículo endoplasmico (Fig. 13-2). La estructura y funciones de estas membranas se discutirán más detallada mente en el Cap. 13 y en el 15. La membrana del retículo endoplásmico tiene la misma apariencia que la superficie de la membrana plasmática. Este sistema de vesículas varia mucho de forma tanto de un tipo a otro de célula, como también en las diferentes etapas fisiológicas y de desarrollo del mismo tipo de célula. La apariencia del retículo endoplásmico puede ser "rugosa" cuando tiene en su lado citoplasmático numerosos gránulos muy juntos (de 150 Å de diámetro) llamados ribosomas (Figs. 13-2 y 15-6) o puede ser "lisa" cuando no contiene ribosomas (Fig. 15-6).

El examen del retículo endoplásmico revela que éste tiene conexión con otras dos estructuras. Primero, se continúa con un sistema de vesículas, fuertemente unidas y de superficie lisa, con una posición característica en la célula cerca del núcleo.



Fig. 3-5. Microfotografías electrónicas de reedificaciones de la membrana plasmática. A: Microvellos como borde de cepillo de una célula mucosa intestinal (x 69750). B: Vesículas pinocíticas observadas en una célula endotelial de un vaso capilar en un músculo del esqueleto (X 46500). UM, membrana unidad; PM, membrana plasmática; L, lumen; C, citoplasma; PS, espacio pericapilar; Pv, vesículas pinocíticas. (Cortesía de Palade)

Esta estructura llamada complejo de Golgi (aparato) ha sido objeto de controversia por muchas décadas hasta que al fin, su existencia fue claramente demostrada con el microscopio electrónico. La función del complejo de Golgi es, hasta la fecha un misterio, aunque se le ha acreditado que desempeña una misión en la secreción de moléculas gigantes (macromoléculas) en la célula animal.

Segundo, la membrana del retículo endoplásmico es una continuación de la membrana más externa de las dos que en vuelven al núcleo (Fig. 15-6). La estructura de las dos membranas posee poros, los cuales pueden o muchos no pueden ser cerrados, de manera que topológicamente y, quizás, fisiológicamente, la parte interior del núcleo está unida con el interior de la célula.

Hasta ahora hemos concretado nuestro examen a la parte exterior de la célula y a la porción interna que es continuación de ella. Si penetramos a través del grosor de la membrana, encontramos el interior de la célula, una rica mezcla de macromoléculas, compuestos orgánicos más pequeños e iones, que forman la sustancia fundamental o matriz citoplasmática. Este material coloidal, tiene la propiedad inusitada de comportarse como una corriente viscosa como si fuera líquido o sufrir una deformación elástica como si fuera sólido. Además, puede variar hasta convertirse totalmente en sólido o en líquido. En conjunto, la matriz citoplasmática, cerca de la membrana exterior, tiende a ser más bien sólida, en tanto que la interior tiende a ser más bien líquida. Pero mucho depende del tipo o del estado fisiológico de la célula. Desde hace años, ha habido muchas controversias acerca de la existencia de una estructura organizada en la sustancia fundamental, a un nivel submicroscópico. Aunque hasta ahora no se ha descubierto un claro esqueleto citoplasmático con el microscopio electrónico, tenemos ciertos ejemplos de organización fibrilar en la matriz citoplasmática. Existe, por ejemplo, el par de centriolos con su hermosa organización, exacta y universal, de fibras "3 x 9" (Fig. 3-6). Estos dos cuerpos están en ángulo recto uno con respecto del otro cerca del núcleo, y parece que desempeñan un papel en la formación del huso durante la división celular. Aquí en el huso, se encuentra otro ejemplo de organización fibrilar en la matriz citoplasmática, la cual, como se muestra en la Fig. 3-6, se puede observar en un material viviente con la ayuda del microscopio de luz polarizada (véanse también las fotografías de la Pag. 2).

Muchas células son ciliadas o flageladas. Estas prolongaciones móviles de la matriz citoplasmática son capaces de convertir energía química en trabajo. Parece que se originan de los cinetosomas o cuerpos basales. Tanto éstos como el propio cilio tienen una organización fibrilar que mucho se asemeja a la del centriolo (Fig. 3-6). La organización fibrilar "9 + 2" de los cilios y de los centrosomas tiene una dramática uniformidad en todo el mundo vegetal y animal, que va desde la planta unicelular *Euglena* hasta el espermatozoide del hombre.

Otro ejemplo de organización fibrilar en la matriz citoplasmática se encuentra en la altamente especializada célula muscular (Figs. 14-3 y 14-4). Aquí se han organizado dos tipos de fibras de proteína en una forma altamente regular y se supone que son las responsables de las propiedades contráctiles del músculo. En

conjunto, parece que la matriz citoplasmática es capaz de varias formas de organización fibrilar que se supone están implicadas en la conversión de la energía química en trabajo mecánico. Puesto que la rápida corriente citoplasmática de las células primitivas, como las de los mohos mucosos, ha demostrado contener macromoléculas capaces de convertir la energía química en trabajo, deducimos que, aun cuando no sean visibles estructuras fibrilares en el citoplasma, es posible, para elementos submicroscópicos contenidos en él, iniciar una actividad organizada en el citoplasma en una escala macroscópica.

La matriz citoplasmática sostiene o rodea a varios "orgánulos", cada uno de los cuales está envuelto por una membrana.

Estos son los mitocondrios, los cloroplastos (en las plantas verdes), los lisozomas, el núcleo y otros diversos cuerpos o granúlos, como los gránulos de grasa.

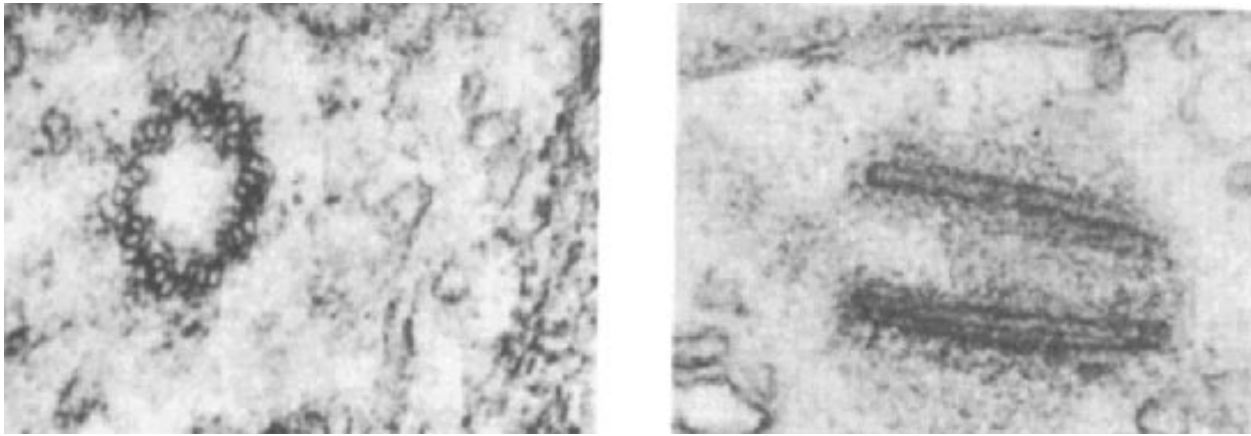


Fig. 3-6. (*Arriba y al frente*). Algunas organizaciones fibrilares de la matriz citoplasmática, o sustancia fundamental. *Arriba*: Centriolo en una célula del timo de rata. Izquierda, corte transversal; derecha, corte longitudinal (x73300). (Cortesía de E. de Harven, Rockefeller Institute.) *Al frente*; arriba, cilios de la agalla del mejillón de agua dulce *Anodonta catartecta*. El conjunto de cilios se extiende hacia fuera desde los cuerpos basales del citoplasma de la célula epitelial (x34000). (Cortesía de I. Gibbons, Harvard University.) *Abajo a la izquierda*, corte transversal de un flagelo del protozoo *Trichonympha* (x127500). Cortesía de Gibbons.) *Abajo a la derecha*, corte transversal de un cuerpo basal en al *Trichonympha* (x127500). (Cortesía de Gibbons)

El mitocondria (véase Cap. 11) es una estructura con doble membrana, estando la exterior fuertemente adherida alrededor de él y la interior invaginada dentro del cuerpo del orgánulo en forma de pliegues, o crestas, para formar una enorme superficie (Fig. 11-1). El mitocondrio es el centro del metabolismo respiratorio de la célula, en donde sus alimentos son oxidados, originando bióxido de carbono y agua, y la energía liberada es empleada para convertir el DFA en TFA. Nosotros sospechamos que la amplia rea de la membrana interior lleva la gran cantidad de enzimas que necesita este proceso. La localización y número de mitocondrios en una célula están en ínfima relación con la función de la misma.

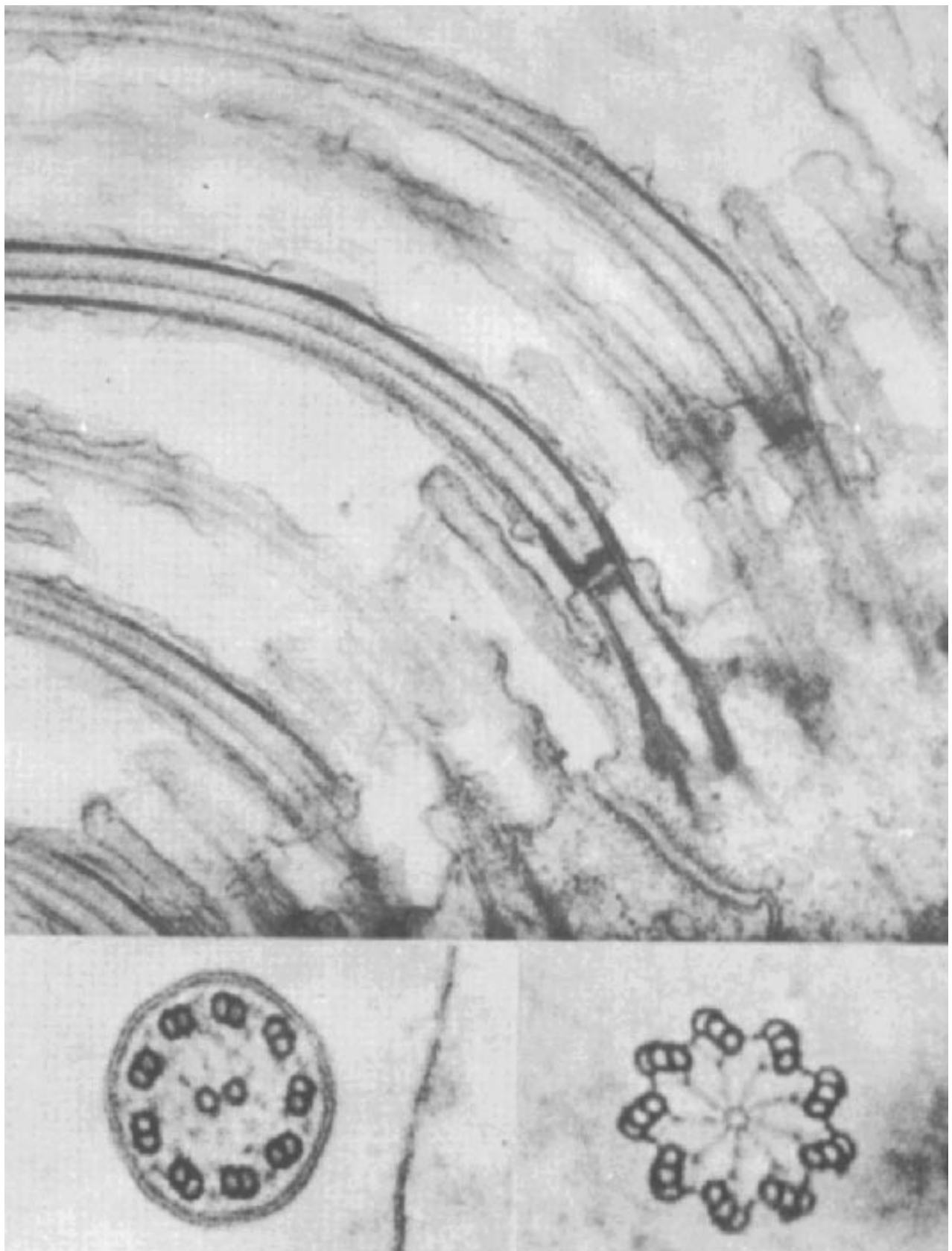
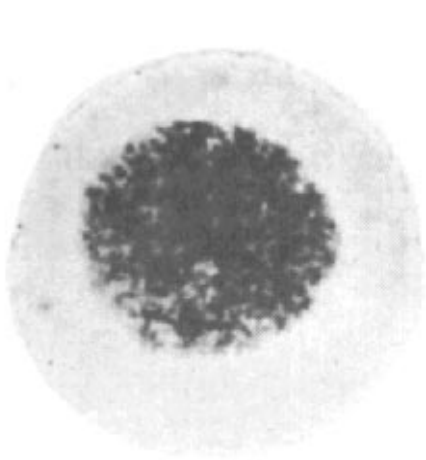
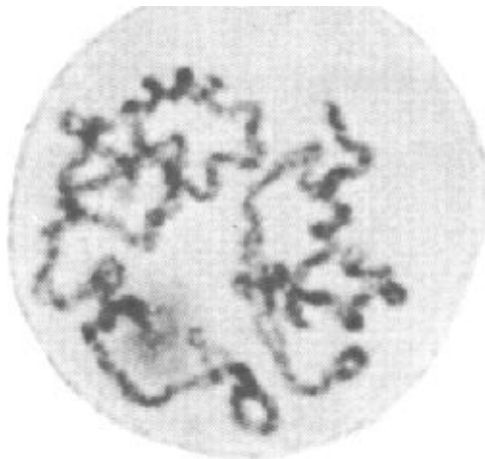


Fig 3-6



1. Interfase



2. Profase



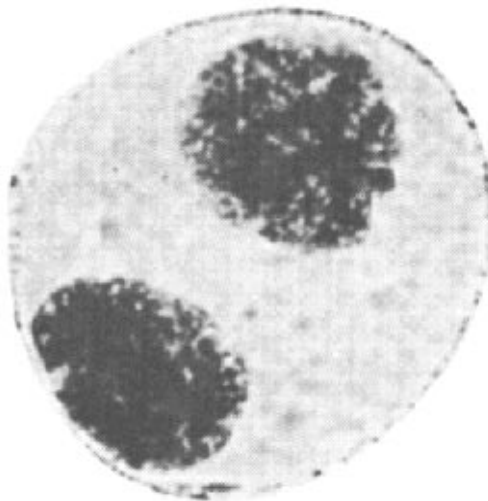
3. Prometáfase



4. Metafase



5. Anáfase



6. Telófase

Fig. 3-7 Varias etapas del ciclo mitótico en microsporas del *Trillium erectum* (Cortesía de A.H. Sparrow y R.F. Smith, Brookhaven National Laboratory)

Los cloroplastos son corpúsculos altamente organizados de las plantas verdes y son los centros de la actividad fotosintética.

Una descripción más detallada de estos interesantes orgánulos se encontrar en La Planta Viviente, de esta serie.

Los lisomas son cuerpos esféricos que parecen contener varias enzimas 'digestivas' de la célula. La función de estos corpúsculos apenas se está comprendiendo. Se ha sugerido que fagocitarias pueden estar implicadas en la digestión de partículas extrañas, como las bacterias.

El núcleo, como su nombre lo indica, es el orgánulo central o crucial de la célula. Es el lugar donde se encuentra la mayor parte del material hereditario de la célula. (véase Cap. 12). El material hereditario está localizado en hilos muy largos y finos (cromosomas) agrupados relativamente muy juntos en el núcleo, y dentro de la célula tiene lugar un ingenioso proceso, por el cual, (los cromosomas autoduplicados son repartidos de la misma forma en las células hijas (véase Genética, en esta serie). Este proceso (Fig. 3-7) implica el acortamiento y engrosamiento de los hilos (profase), acompañado por la ruptura de la membrana nuclear, la formación de un huso polar extendiéndose entre los dos centriolos, la emigración de los cromosomas dobles al plano ecuatorial (metafase), y la separación de estos cromosomas dobles con el subsecuente movimiento a las puntas del huso (anafase). Finalmente, se verifica la inversa de la profase esto es, el alargamiento y adelgazamiento de los cromosomas, la ruptura del huso, la duplicación del centrosoma, y la formación de la membrana nuclear (telofase). Este proceso, llamado mitosis, está en correlación en tiempo con la contracción o división de la célula en dos células hijas. Debido a que es un asunto intrigante y a causa de que los cortos y gruesos cromosomas, durante la división, se tiñen rápidamente con colorantes y son visibles al microscopio de luz, la mitosis ha sido objeto de estudios intensivos en la primera mitad de este siglo.

El sorprendente resultado de estos estudios ha sido la correlación de la conducta de los cromosomas visibles con el comportamiento de las unidades genéticas como se observan a través de sus efectos hereditarios. La localización del gen abstracto, en los cromosomas visibles, ha sido el triunfo de la biología de principios del siglo veinte. Sin embargo, el estudio de los cromosomas con el microscopio electrónico, ha probado, hasta ahora, ser uno de los fracasos más notables de la citología moderna.

Con pocas excepciones, muy poco se puede ver, excepto unas burbujas amorfas, y todo mundo espera que, con un mejoramiento técnico en la fijación, teñido o corte, se remediará esta situación poco satisfactoria.

El núcleo que no se divide, en el microscopio de luz, no está completamente vacío. Contiene uno o más corpúsculos que se tiñen rápidamente con los colorantes basofílicos y que se les ha denominado nucleolos (Figs. 3-3 y 3-4). Esta estructura puede verse fácilmente en el microscopio electrónico como un conjunto rico de gránulos que son aproximadamente del tamaño y apariencia de los ribosomas. Puede

ser que verdaderamente sean un conjunto de ribosomas que son sintetizados en el núcleo y que en realidad pasa o son arrojados, a través del poro nuclear, dentro de la matriz citoplasmática, pero hasta ahora, sólo podemos especular. Una vez fuera del núcleo, probablemente permanecen libres, o bien se unen al retículo endoplasmático. Como veremos con más amplitud en los Caps. 12 y 13, los ribosomas parecen ser receptores de "mensajes" específicos procedentes de los genes del núcleo. Estos mensajes presuntamente permiten las síntesis de proteínas catalíticas y estructurales específicas, que regulan la vida de la célula.

Ha sido nuestro intento en este capítulo, discutir en términos generales, la conducta y la estructura de la célula e indicar el nivel en el cual se encuentran en relación la estructura y la función. Es claro que una comprensión más profunda de estos fenómenos solamente se puede obtener, estudiándolos desde un punto de vista molecular. Para hacer esto eficientemente, el estudiante debe tener fundamentos adecuados sobre la química de las moléculas de la célula (Caps. 4 al 8). Armado con estos recientes conocimientos, puede volver de nuevo sobre sus pasos y reexaminar el objeto de este capítulo en el lenguaje de la moderna biología molecular (Caps. 9 al 16).

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

Bloom, W., and Fawcett, D. W., 1962. *Textbook of histology*. Philadelphia: Saunders.

Brachet, J., and Mirsky, A. E., eds., 1959-1961. *The cell*. New York: Academic Press.

Brachet, J., 1957. *Biochemical cytology*. New York: Academic Press.

Davson, H., 1959. *A textbook of general physiology*. Boston: Little, Brown.

De Robertis, E. D. P., Nowinsky, W. W., and Saez, F. A., 1960. *General cytology*, 3d ed. Philadelphia: Saunders.

Engstrom, A., and Finean, J. B., 1958. *Biological ultrastructure*. New York: Academic Press.

Giese, A. C., 1962. *Cell physiology*, 2d ed. Philadelphia: Saunders.

Mazia, D., "How cells divide." *Scientific American*, September 1961.

Picken, L. E. R., 1960. *The organization of cells and other organisms*. Oxford: Clarendon Press.

Thompson, D'Arcy W., 1961. *On growth and form*, abridged ed. Cambridge: Cambridge University Press.

Wilson, E. B., 1928 (reprinted in 1953). *The cell in development and heredity*. New York: Macmillan.

CAPITULO CUATRO

LA VIDA Y LA TABLA PERIODICA

Una propiedad característica de la materia viviente es la de ser selectiva en sus relaciones con el medio ambiente. Un ejemplo de esta selectividad es la considerable diferencia entre la abundancia de elementos que se encuentran en la tierra y los que se hallan en los organismos vivientes. La corteza terrestre está formada principalmente de oxígeno, silicio, aluminio, sodio, calcio, hierro, magnesio y potasio; los elementos restantes constituyen menos del 1% del total. Los organismos vivientes, por otra parte, están constituidos primordialmente de hidrógeno, oxígeno, carbono y nitrógeno, con los elementos restantes constituyendo menos del 1% del total (véase la Tabla 41). Así, con la excepción del oxígeno, los elementos más abundantes no se presentan en común en la corteza terrestre y en la materia viviente. El oxígeno, con un número atómico de 8, es el más pesado de los principales elementos de la materia viviente y, al mismo tiempo, el más liviano de los principales elementos de la corteza terrestre. De todo esto concluimos, que la materia viviente selecciona, de preferencia, a los elementos livianos que se encuentran disponibles en la corteza terrestre y en la atmósfera.

Es sorprendente a este respecto, que la materia viviente sea muy semejante al cosmos como un todo. Las estrellas, así como la materia interestelar, están compuestas principalmente de elementos livianos. Nuestra tierra no es más que una "ceniza mineral" de elementos pesados que quedaron después de que los elementos livianos pasaron al espacio debido a la débil atracción gravitacional de la pequeña tierra. La Fig. 4-1 muestra el paralelismo que, con excepción del helio, se encuentra entre los 30 primeros elementos en el cosmos y en el organismo viviente. Si el sorprendente paralelismo es una coincidencia o una forma de conservación biológica de la composición química del ambiente presente cuando se originó la vida, es, hasta la fecha, un asunto de especulación.

Aunque la materia viviente con frecuencia contiene vestigios de todos los elementos que se hallan en su medio ambiente, se ha demostrado que sólo 20 elementos son esenciales para la vida. Por conveniencia se han clasificado en tres categorías principales de acuerdo con su concentración relativa en la célula (Tabla 4-2): constituyentes principales, elementos, vestigios y elementos ultravestigios.

TABLA 4 -1. ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS 14 ELEMENTOS PRINCIPALES EN EL UNIVERSO, EN LA CORTEZA TERRESTRE Y EN EL CUERPO HUMANO (RECALCULADOS POR EDSALL Y WYMAN)

Elemento	Número atómico	Abundancia relativa en porcentaje de átomos		
		Universo	Corteza terrestre	Cuerpo humano
Hidrógeno	1	91		60
Carbono	6	0.91		11
Nitrógeno	7	0.42		2.4
Oxígeno	8	0.057	62.6	26
Sodio	11	0.00012	2.6	0.7
Magnesio	12	0.0023	1.8	0.01
Aluminio	13	0.00023	6.5	
Silicio	14	0.626	21.2	0.00091
Fósforo	15	0.00034		0.13
Azufre	16	0.0091		0.13
Cloro	17	0.00044		0.033
Potasio	19	0.000018	1.4	0.037
Calcio	20	0.00017	1.9	0.22
Hierro	26	0.047	1.9	0.00059

Se ha demostrado que no todos estos elementos son requeridos por todas las especies. Sabemos que algunos de ellos son de importancia universal (H, C, N, O, Na, Mg, P, S, Ca, K) en tanto que otros son requeridos por un gran número de especies y, por lo tanto, probablemente también sean de importancia general (Fe, Cu, Mn, Zn). Hasta ahora no se ha establecido la universalidad de los elementos restantes (B, Si, V, Co. Mo.).

El estudio de los elementos ultravestigios esenciales es aún un problema; nunca se puede tener la certidumbre de que un elemento en particular no es requerido, puesto que es un proceso muy laborioso y técnicamente complicado probar que es necesario. El procedimiento implica el empleo de agua y de reactivos ultrapuros y aun al material de vidrio. Así, la necesidad alimenticia de algunos elementos ultravestigios no se sospechó hasta que su ausencia casi total en ciertos suelos ocasionó la aparición de enfermedades y anormalidades en plantas o animales. La ausencia de cobre en algunas regiones de Australia causó una enfermedad en las ovejas originando efectos permanentes en el sistema nervioso, anemia y deterioro de la lana con pérdida del ensortijamiento. Se ha observado que una deficiencia de boro en el suelo ocasiona la "podredumbre del corazón" en las remolachas, el "agrietamiento del tallo" en el apio, el "corcho interior" en las manzanas y muchas otras anormalidades en las plantas.

TABLA 4-2. ELEMENTOS NECESARIOS PARA LA VIDA Y ALGUNAS DE SUS FUNCIONES

Categoría	Elemento	Simbolo	Número atómico	Algunas funciones desconocidas
Componentes principales 2-60 átomos por ciento	Hidrógeno	H	1	Universalmente requeridos para los compuestos orgánicos de la célula
	Carbono	C	6	
	Nitrógeno	N	7	
	Oxígeno	O	8	
Elementos vestigio 0.02-0.1 %	Sodio	Na	11	Importante ion contrasrestador implicado en el potencial de acción.
	Magnesio	Mg	12	Cofactor de muchas enzimas
	Fósforo	P	15	Universalmente implicado en reacciones de transferencia de energía.
	Azufre	S	16	Encontrado en las proteínas y en otras sustancias importantes
	Cloro	Cl	17	Uno de los principales aniones.
	Potasio	K	19	Importante ion contrarrestador implicado en la conducción nerviosa, en la contracción muscular, etc.
	Calcio	Ca	20	Cofactor en las enzimas, importante componente de las membranas y regulador de la actividad de éstas.
	Boro	B	5	Importante en las plantas, probablemente como cofactor de enzimas.
	Silicio	Si	14	Encontrado en abundancia en muchas formas inferiores.
	Vanadio	V	23	Encontrado en ciertos pigmentos de formas inferiores
Elementos Ultravestigio menos de 0.001%	Manganeso	Mn	25	Cofactor de muchas enzimas
	Hierro	Fe	26	Cofactor de muchas enzimas de oxidación.
	Cobalto	Co	27	Componente de la Vit. B12
	Cobre	Cu	29	Cofactor de muchas enzimas de oxidación.
	Cinc	Zn	30	Cofactor de muchas enzimas
	Molibdeno	Mo	42	Cofactor de unas cuantas enzimas.

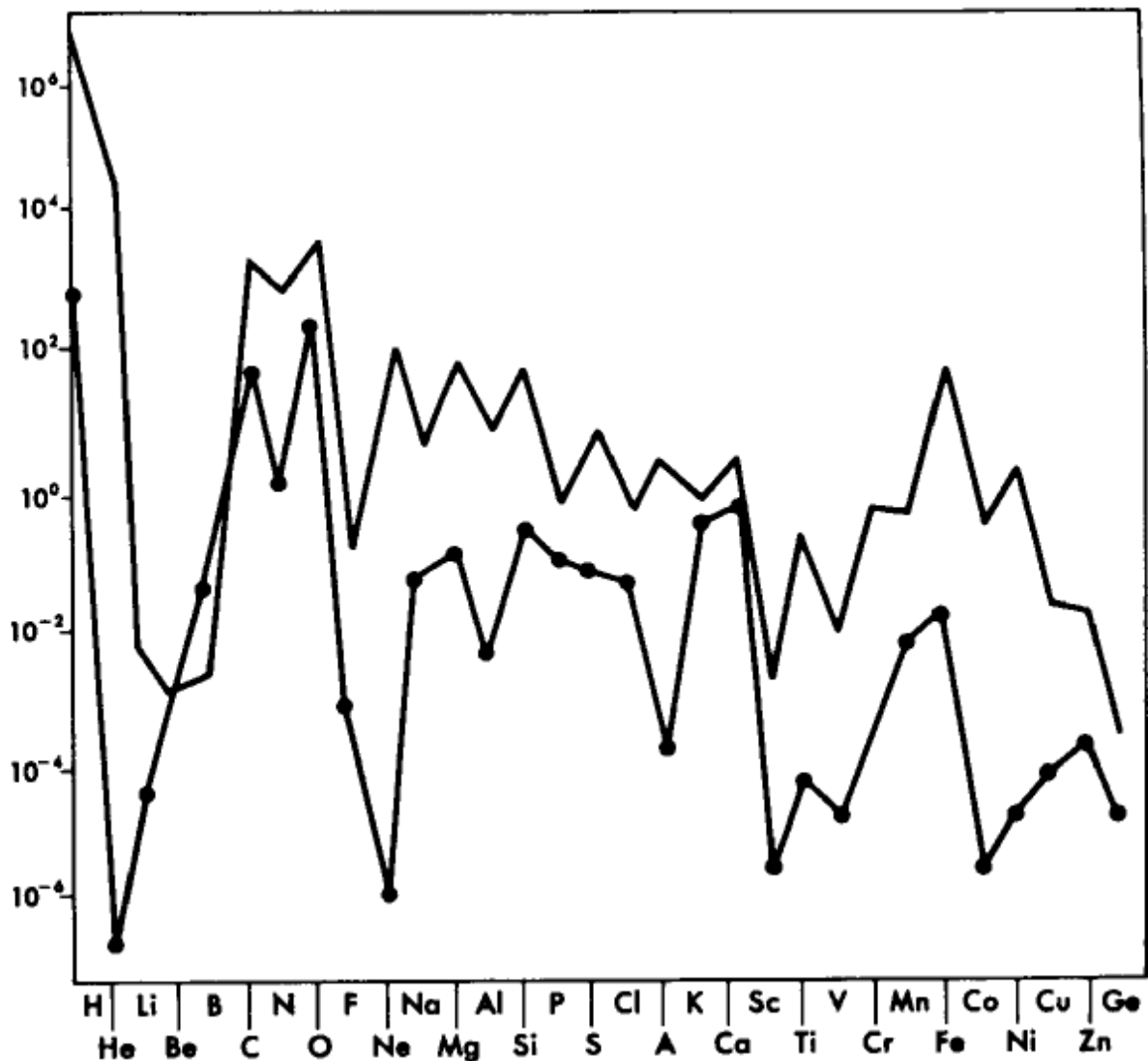


Fig. 4-1. Abundancias relativas de los primeros 31 elementos en el cosmos (por cada 100 átomos de Si) y en los organismos vivientes sobre la superficie terrestre (por cada 100 átomos de C). (Cortesía de G. E. Hutchinson, 1943; sin corregir para los datos recientes)

La mejor forma de demostrar la necesidad en la nutrición de elementos ultravestigios tales como el boro, es curando la enfermedad por deficiencia por medio de la adición de estos elementos al suelo. Una centésima parte del elemento por mil millones de suelo causará la enfermedad, una décima parte por mil millones la curará y una parte por mil millones es una concentración lo suficientemente elevada para envenenar a la planta.

¿Cuál es el papel de los veintitantos elementos en la máquina viviente? Los elementos H, C, N, O, P y S son los materiales de construcción de los compuestos orgánicos de la célula. La mayor parte de los carbohidratos y de los lípidos

contienen H, C, y O en tanto que las proteínas contienen además, N y S y los ácidos nucleicos, N y P. Así, estos seis elementos son los componentes principales de la máquina viviente. La capacidad para permutaciones y combinaciones diferentes de estos elementos para dar origen a la diversidad molecular de la célula, los hace únicos en su idoneidad para sostener la vida. Las moléculas celulares, en la naturaleza, parten desde el bióxido de carbono gaseoso, a través del agua en estado líquido, hasta la celulosa sólida, y desde los aminoácidos altamente polares, a través de la glucosa menos polar, hasta las grasas no polares. Se ha sugerido, de vez en cuando, que en otro sistema planetario, el silicio podría reemplazar al carbono. Esto parece poco probable cuando uno se pone a considerar todo el conjunto de compuestos y propiedades que se encuentran en el mundo del carbono que difícilmente se puede comparar con el mundo del silicio que se supone.

Muchos de los elementos se encuentran, generalmente, bajo la forma de iones; así Na^+ , Mg^{+2} , PO_4^{-3} , SO_4^{-2} , Cl^- , K^+ y Ca^{+2} y de los principales elementos bajo la forma de CO_3^{-2} , y NO_3^- . La importancia de estos iones para el bienestar de la célula se ha reconocido desde hace mucho tiempo. Así, la literatura sobre fisiología de la década de los veinte y de los treinta, está llena de observaciones sobre el efecto de iones tales como el Na^+ , Mg^{+2} , K^+ y Ca^{+2} sobre la consistencia física y funcionamiento de gran variedad de células. Las cantidades absolutas y el equilibrio relativo de estos iones se conservan en los sistemas vivientes dentro de límites muy estrechos y cualquier variación experimental de estas cantidades, da por resultado cambios muy notables en las propiedades biológicas tales como permeabilidad celular, irritabilidad, contractibilidad, viscosidad protoplasmática y división celular. La importancia del equilibrio entre estos cationes, se puede comprender considerando el hecho de que frecuentemente se ha observado que pares de estos iones poseen efectos antagónicos el uno sobre el otro. Así, se sabe que el K^+ disminuye la viscosidad protoplasmática y causa el relajamiento muscular, en tanto que el Ca^{+2} origina la gelación del protoplasma celular y también inicia la contracción muscular.

La importancia de la composición iónica y el equilibrio en los sistemas vivientes, también se puede ilustrar por el grado de conservación tan notable de este parámetro a través de toda la evolución biológica. La Tabla 4-3 da la composición iónica de varios organismos de diferentes tipos de evolución, comparada con la composición iónica del agua de mar. A. B. Macallum fue el primero en deducir que el paralelismo que se muestra en ella, significa que la vida se originó en el mar y que la evolución subsecuente hizo poco, para cambiar el equilibrio iónico. Después de mil millones de años de evolución sobre la tierra, aunque nuestros fluidos corporales están menos concentrados que el agua de mar, todavía llevamos el equilibrio iónico del agua de mar en nuestras células y líquidos del cuerpo.

Hay hasta la fecha, muy poca comprensión sobre una base molecular del papel de estos iones. Tanto las proteínas como los ácidos nucleicos (que son los principales componentes macromoleculares de la célula) son iones polivalentes negativamente

cargados y necesitan de cationes como iones compensadores. Además, se ha demostrado que existen relaciones especiales entre ciertas macromoléculas y cationes específicos. Así, la concentración del Mg^{+2} se ha demostrado que afecta al estado de agregación de los ribosomas, probablemente debido a su acción sobre los componentes del ARN, de estos cuerpos. Se ha demostrado que estos pequeños orgánulos citoplasmáticos de los cuales trataremos más adelante, se desdoblan en dos componentes más pequeños cuando se disminuye la concentración del Mg^{+2} . Es casi seguro que el calcio es un ion contrarrestador para los componentes fosfolípidos de los sistemas de la membrana celular, y el efecto del Ca^{+2} en la disminución del umbral de la excitabilidad nerviosa, es un ejemplo de esto. Y finalmente, se ha demostrado que el potasio interreacciona selectivamente con la miosina, la proteína contráctil del músculo. Estos son sólo unos cuantos ejemplos de un campo de la biología de la célula que aún tiene que ser explorado completamente en el nivel molecular.

Pero, ¿qué sucede con los elementos ultravestigios? ¿Qué papel razonable podría desempeñar un elemento si se encontrara presente en una concentración de 10^{-8} M? La respuesta parece sencilla y clara. En todos los casos que se han examinado en detalle, estos iones resultaron ser "cofactores" necesarios para ciertas enzimas biológicas. Puesto que las enzimas, a causa de su naturaleza catalítica, son requeridas por lo regular sólo en muy bajas concentraciones, se deduce que sus cofactores, asimismo, se les necesita igualmente en muy bajas concentraciones.

Un pequeño porcentaje de los elementos vestigios mencionados anteriormente, también están implicados en la activación de la enzima. La Tabla 4-4 da unos cuantos ejemplos de reacciones que utilizan enzimas que requieren ciertos cofactores metálicos específicos.

Algunos de los iones metálicos pueden ser impedidos de desempeñar su papel por la presencia de ciertos inhibidores. Los cuatro átomos de hierro de la proteína hemoglobina son el lugar de la función transportadora de oxígeno de esa molécula. El cianuro o el monóxido de carbono pueden ligarse, de preferencia, con el hierro y en consecuencia, interferir con la capacidad de la proteína para transportar oxígeno. Tales compuestos son venenos y aun, a muy bajas concentraciones, capaces de causar la muerte de las células.

TABLA 4-3. COMPOSICION IONICA DEL AGUA DE MAR Y DE LOS FLUIDOS DEL CUERPO DE VARIAS ESPECIES. (LOS NUMEROS SUPERIORES ESTAN EXPRESADOS EN CONCENTRACION MILIMOLAR (mM) POR LITRO; LOS INFERIORES SON RELATIVOS, EXPRESADOS EN TERMINOS DE 100 UNIDADES DE Na⁺)

	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Cl ⁻	SO ₄ ⁻²
VERTEBRADOS						
Hombre (mamífero)	145 (100)	5.1 (3.5)	2.5 (1.7)	1.2 (.83)	103 (71)	2.5 (1.7)
Rata (mamífero)	145 (100)	6.2 (4.2)	3.1 (2.1)	1.6 (1.1)	116 (80)	
Rana (anfibio)	103 (100)	2.5 (2.4)	2.0 (1.9)	1.2 (1.2)	74 (72)	
Lophius (pez)	228 (100)	6.4 (2.8)	2.3 (1.0)	3.7 (1.6)	164 (72)	
INVERTEBRADOS						
Hydrophilus (insecto)	119 (100)	13 (11)	1.1 (.93)	20 (17)	40 (34)	0.14 (.13)
Cangrejo (artrópodo)	465 (100)	8.6 (1.9)	10.5 (2.3)	4.8 (1.0)	498 (110)	10 (2.2)
Venus (molusco)	438 (100)	7.4 (1.7)	9.5 (2.2)	25 (5.7)	514 (120)	26 (5.9)
Pepino de mar (equinodermo)	420 (100)	9.7 (2.3)	9.3 (2.2)	50 (12)	487 (120)	30 (7.2)
Agua de mar	417 (100)	9.1 (2.2)	9.4 (2.3)	50 (12)	483 (120)	30 (7.2)

TABLA 4-4. ALGUNAS REACCIONES ENZIMATICAS QUE REQUIEREN METALES

glucosa + TFA	hexoquinasa, Mg^{+2}	glucosa-6-P + DFA
	$\Rightarrow$	
Triptofano + H ₂ O	triptofanasa, K^{+} o Rb^{+}	indol + piruvato + NH ₃
	$\Rightarrow$	
fibrina soluble	Fibrinasa, Ca^{+2}	fibrina insoluble
	$\Rightarrow$	
arginina + H ₂ O	arginasa, Co^{+2} , Mn^{+2} o Ni^{+2}	urea + ácido 2,5diaminovalérico
	$\Rightarrow$	
histidina	descarboxilasa de histidina, Fe^{+3} o Al^{+3}	histamina + CO ₂
	$\Rightarrow$	
catecol	oxidasa de fenol, Cu^{+2}	o-benzoquinona
	$\Rightarrow$	
ácido láctico + DPN	deshidro genasa láctica, Zn^{+2}	ácido pirúvico + DPNH
	$\Rightarrow$	
nitrito + TPNH + H ⁺	reductasa de nitrato, Mo^{+2}	nitrito + TPN ⁺ + H ₂ O
	$\Rightarrow$	

Hemos visto que la materia viviente selecciona, de un medio ambiente, alrededor de 20 elementos específicos con los cuales construye su tejido. En los próximos cuatro capítulos examinaremos algunas moléculas que son elaboradas por la célula y que desempeñan las más importantes funciones de la maquinaria de la vida.

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

EDSALL, J. T., and WX, MAN, J., 1958. *Biophysical chemistry*. New York: Academic Press.

Fowler, W. A., "The origin of the elements," *Scientific American*, September 1958.

Henderson, L. J., 1958. *The fitness of the environment*. Boston: Beacon Press.

CAPITULO CINCO

EL AGUA Y LA VIDA

El agua es el medio de dispersión de la materia viviente. Aun se ha encontrado que, en realidad, el medio acuático es el ambiente de los organismos terrestres que a primera vista parece que viven en un medio gaseoso, cuando se les examina en el nivel celular. Las células vivas en actividad contienen de 60 a 95% de agua y la importancia de ésta, se puede apreciar por medio de la observación de que hasta células en estado de vida latente y tejidos como esporas y semillas contienen de 10 a 20% de agua.

La ubicuidad del agua no hace desmerecer sus propiedades especiales y únicas. Es precisamente esta propiedad de ser única, lo que hace al agua especialmente apropiada para el papel biológico que desempeña. El gran fisiólogo L. J. Henderson escribió un libro titulado *The Fitness of the Environment*, en el cual demostró que los fenómenos de la adaptación biológica se podían considerar, no solamente desde el punto de vista de la adaptación de los organismos a su medio ambiente, sino también desde el punto de vista inverso principalmente considerando lo apropiado del medio físico para el sostenimiento de la vida.

El agua es un hidruro de oxígeno que posee un fuerte y desigual grado de interacción entre sus moléculas. La Fig. 5-1 muestra el calor de evaporación como una medida de la resistencia de la fuerza intramolecular. Vemos que en el caso de la serie del carbono existe una fuerte proporcionalidad entre el elemento que forma el hidruro y su calor de evaporación. Este no es el caso en las otras series en las cuales el primer miembro es muy atípico, siendo el agua el más atípico de todos. La razón para estos grados excepcionalmente fuertes de interacción, es el hecho de que el oxígeno, el flúor y el nitrógeno, forma hidruros en los cuales solamente algunos de sus electrones están implicados en enlaces covalentes con el hidrógeno, mientras que los restantes permanecen muy cerca del átomo, proporcionando fuerte electronegatividad. Así, estas moléculas tienen un alto grado de polaridad eléctrica, la cual, a su vez, ocasiona muy fuertes fuerzas intermoleculares.

Vamos a considerar el caso de la molécula del agua. La forma de esta molécula es la de un triángulo isósceles, con cada uno de los hidrógenos compartiendo dos electrones. La poderosa atracción del núcleo del oxígeno tiende a atraer a los cuatro restantes electrones fuera de los protones, dejando así el área alrededor de ellos con una franca carga positiva.

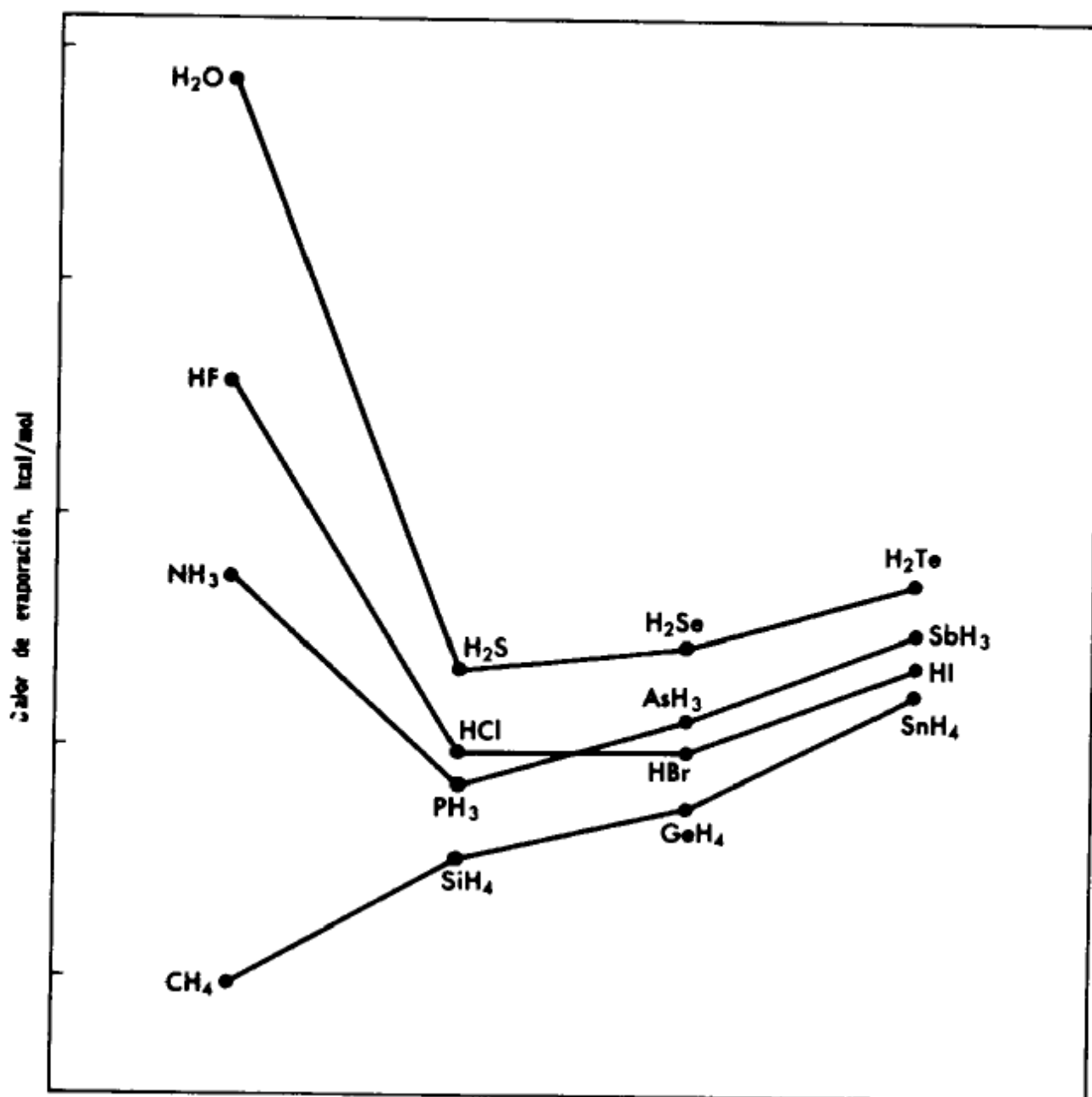


Fig. 5-1. Calores de evaporación de series isoelectrónicas de moléculas de hidruros. (Cortesía de L. Pauling)

Estos dos pares de electrones no compartidos, tienden a concentrarse en una área fuera de los átomos de hidrógeno, dando a esta área una carga negativa. La geometría de esta situación es tal, que si consideramos al átomo de oxígeno como el centro de un tetraedro, los dos centros de carga positivos y los dos negativos, ocuparían los cuatro vértices del tetraedro. Estos centros de carga originan interacciones, de manera que cada molécula posee un efecto orientador sobre sus cuatro vecinos más cercanos. Así, dos áreas negativas atraen cada una a un

hidrógeno (protón) de otras dos moléculas y cada protón atrae al oxígeno de una vecina. Cada átomo de oxígeno viene a ser, en este tipo de interacción, el centro de un tetraedro de otros oxígenos. Existen, por tanto, en el agua, no sólo fuertes fuerzas atractivas sino también un arreglo geométrico de estas mismas, que se prestan muy bien para la información de estructuras tridimensionales. La Fig. 5-2. es una representación del arreglo del agua cristalina.

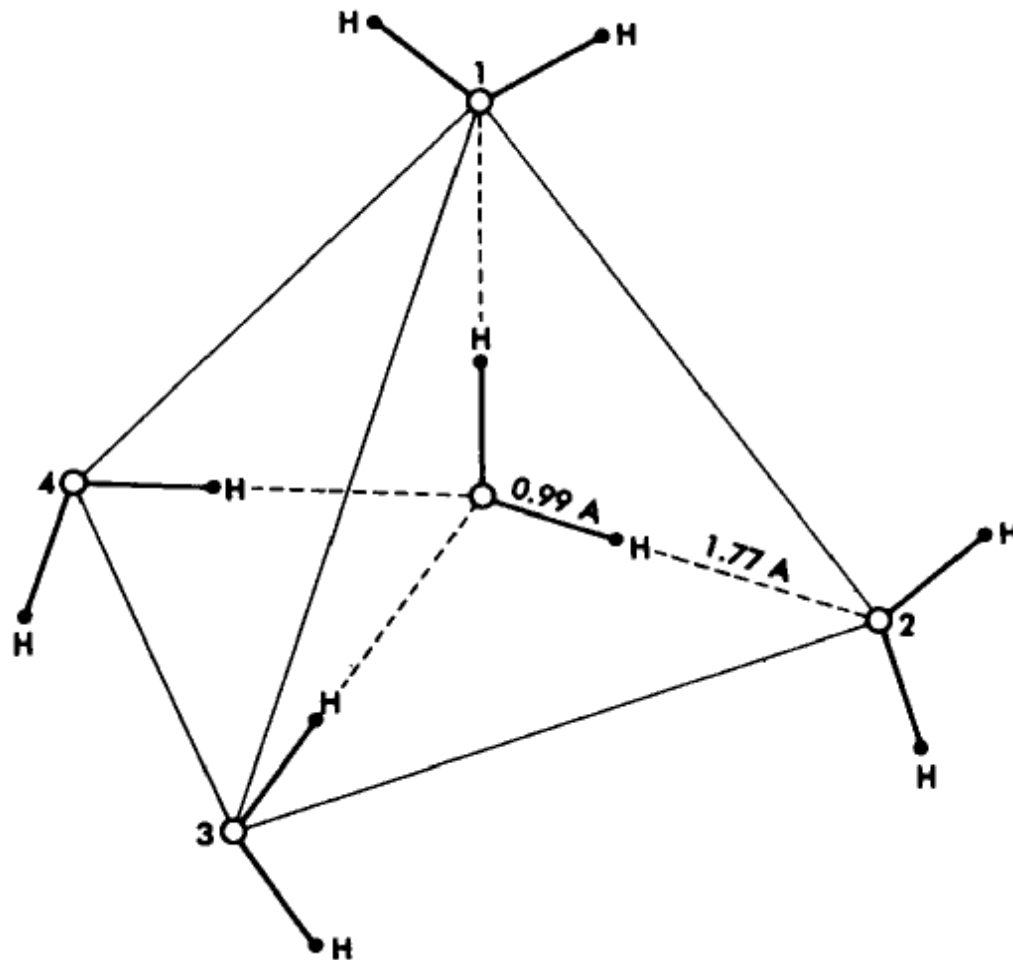


Fig. 5-2. Coordinación tetraédrica de las moléculas del agua en el hielo. Las moléculas 1 y 2, así como la molécula central de H₂O quedan completamente en el plano del papel. La molécula 3 queda arriba de este planos y la 4, abajo; de manera que los oxígenos 1, 2, 3 y 4 quedan en los vértices de un tetraedro regular.

Las ligaduras, representadas por líneas punteadas, se conocen como enlaces de hidrógeno. Estos enlaces también se forman cuando el nitrógeno y el flúor sustituyen al oxígeno, y ésta es la razón del porqué el fluoruro de hidrógeno y el

amoníaco (véase Fig. 5-1), también poseen muy elevados valores de calor de evaporación. Pero en el caso del amoníaco y del fluoruro de hidrógeno, la geometría de las interacciones es tal, que solamente se forman anillos y cadenas, siendo así imposible para ellos, constituir celdillas continuas y tridimensionales. De esto se deduce que las propiedades del agua son absolutamente únicas y sería inverosímil que el amoníaco o el fluoruro de hidrógeno fueran apropiados como medios de dispersión para sistemas vivientes en otros planetas.

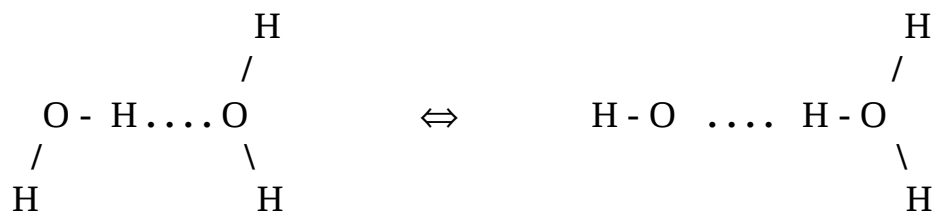
Esta forma notable de interacción del enlace de hidrógeno es más fuerte que las fuerzas usuales de Van der Waals, pero más débil que los enlaces covalentes encontrados en los compuestos orgánicos. Su relativa resistencia la dota de la capacidad para formar estructuras, y su debilidad relativa la dota de movilidad. Sin lugar a duda, la facultad para formar estructuras lábiles da al enlace de hidrógeno una posición preeminente en la conducta del material viviente, un hecho al que tendremos amplia oportunidad de referirnos a través de este libro.

La aglomeración de las moléculas de agua en la celdilla del cristal de hielo es *floja*. Cuando éste se derrite, el acomodamiento regular y flojo cambia a un arreglo al azar pero más compacto, originando un aumento en la densidad. Al estarse derritiendo, la ruptura de la estructura es sólo parcial, dejando una gran cantidad del líquido en un estado "paracristalino", una propiedad única e interesante del agua. A medida que se eleva lentamente la temperatura, se rompe más y más la estructura regular y continúa el aumento de la densidad, alcanzando un máximo a 4°C. Por lo tanto, debido al efecto de la temperatura sobre el aumento en la distancia promedio entre las moléculas del agua, la densidad de ésta disminuye. Esta propiedad especial del agua es responsable de la congelación de los cuerpos de agua procediendo de arriba hacia abajo, y no al revés. La capa de hielo formada, aísla el agua de abajo de pérdida de calor, disminuyendo de esta manera la congelación de lagos y ríos, y protegiendo de esta manera la vida en ellos.

Las formas estructurales que hemos tratado hasta aquí son la causa de otros diversos valores únicos para el punto de fusión, el punto de ebullición, el calor latente de fusión, la capacidad calorífica, la tensión superficial y la constante dieléctrica. Cada una de estas propiedades tiene consecuencias importantes para la materia viviente.

Existen otros tres aspectos de la conducta del agua que son de la más fundamental importancia. Primero, el agua es un excelente solvente para muchos compuestos orgánicos. A causa de la polaridad del agua y su capacidad del enlace de hidrógeno, es capaz de disolver los compuestos orgánicos que contengan grupos hidroxilo (OH), carboxilo (-COOH), amino (-CNH₂), y cetónico (C=O). Al mismo tiempo, también es capaz de disolver sales que estén completamente disociadas en iones. De esta manera, el agua tiene un amplio espectro desigual de acción disolvente.

Segundo, el agua por si misma es capaz de un ligero grado de disociación en la siguiente forma:



La constante de equilibrio (K_w) de esta reacción es de 10^{-14} , lo que significa que un kilogramo de agua contiene solamente 10^{-7} moles de iones H_3O^+ (generalmente, se representan por H^+), y 10^{-7} iones OH^- .

Tercero, el agua provoca la disociación de diversas sustancias llamadas "electrólitos débiles". Si tal sustancia emite un protón (H^+), se denomina ácido débil. Los grupos carboxilo y amino son los electrólitos débiles que más frecuentemente se encuentran en los compuestos orgánicos de la célula (véase el Cap. 6).

Es posible derivar una ecuación sencilla, relacionando la acidez (pH o logaritmo negativo del protón o concentración del ion hidrógeno) con el pK (o sea, el logaritmo negativo de la constante de equilibrio) y la relación de concentraciones base a ácido.

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{base}]}{[\text{ácido}]}$$

Esta ecuación es sumamente útil. Por ejemplo, se puede observar que cuando las concentraciones de base y ácido son iguales, entonces el pH de una solución de un electrólito débil es igual a su pK (puesto que el logaritmo de 1 es igual a 0). En ese punto, la capacidad reguladora del sistema esto es, su resistencia al cambio del pH cuando se añaden o se quitan protones está al máximo. Otra forma de expresar esto es diciendo que a un valor del pH numéricamente igual a su valor del pK, la mitad del ácido está disociada en su base conjugada.

Como veremos en los siguientes capítulos, las macromoléculas, las cuales son las entidades tanto estructurales como funcionales de la célula, son polielectrólitos débiles, que deben su estado de disociación, y de aquí muchas de sus características físicas, a la presencia del agua o de soluciones salinas diluidas. El agua, por lo tanto, no es solamente el medio de dispersión de la célula, sino también, influye mucho sobre las propiedades de las moléculas que dispersa. Las propiedades del agua que hemos discutido, tienen innumerables conexiones con el funcionamiento de la máquina viviente. No es cualquiera sino la presencia simultánea de todas estas propiedades que hacen del agua el solvente único para el mundo de la vida.

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

Buswell, A. M., and Rodebush, W. H., "Water," *Scientific American*, April 1956.

Edsall, J. T., and Wyman, J., 1958. *Biophysical chemistry*. New York: Academic Press.

Henderson, L. J., 1958. *The fitness of the environment*. Boston: Beacon Press.

CAPITULO SEIS

LAS PEQUEÑAS MOLECULAS DE LA MAQUINA VIVIENTE

La química orgánica, o sea, la química del mundo viviente, es la química del carbono. Una sorprendente propiedad de los compuestos del carbono, utilizados por el mundo de la vida, es que son notablemente inertes, reaccionando sólo en proporciones infinitesimalmente bajas, unos con otros, con el agua y con el oxígeno atmosférico. Esto es así, a pesar del hecho de que grandes cantidades de energía, frecuentemente, se ponen en libertad cuando estos compuestos reaccionan. En el Cap. 9 veremos cómo la célula vence esta lentitud de los compuestos orgánicos y la utiliza para fines de control molecular. Una segunda propiedad sorprendente del carbono es su versatilidad para formar un número casi ilimitado de compuestos que varían enormemente en sus propiedades. Esta falta de actividad aunada con la versatilidad de los compuestos orgánicos de la célula es debida a las siguientes propiedades del carbono.

Primero, el carbono es un elemento liviano con número atómico 6. Comparte, con otros elementos en la segunda fila horizontal de la tabla periódica, la incapacidad para ensanchar su octeto. Así, los compuestos de carbono tetravalente, no son complejos o solvatados en una cantidad apreciable. Puesto que las reacciones de otros elementos generalmente se verifican por medio de intermediarios coordinados, no es de sorprenderse que la mayoría de las reacciones de los compuestos del carbono sean lentos, aunque algunas de éstas puedan poner en libertad gran cantidad de energía.

Segundo, estando el carbono situado en el centro de la tabla periódica, es capaz de reaccionar tanto con los elementos electronegativos como el oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre y cloro, así como con el hidrógeno, que es un elemento electropositivo.

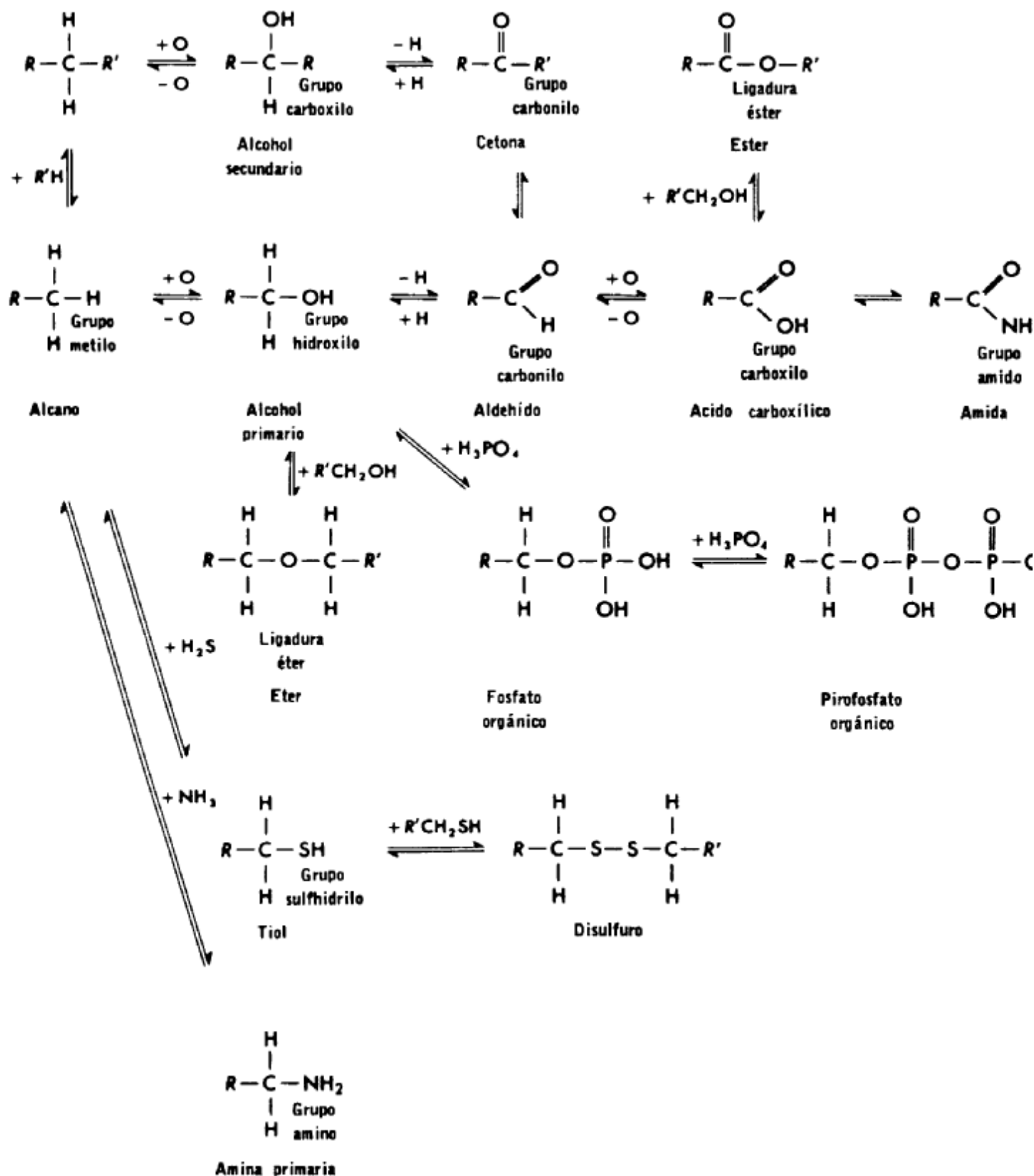


Fig. 6-1. Grupos alifáticos principales

De manera que se conocen compuestos de carbono, en los cuales se le puede asignar al átomo de carbono, estados de oxidación de -4, -2, 0, +2 y +4. Esta capacidad para reaccionar con una variedad de elementos tanto electropositivos como electronegativos, se ha extendido aun más con la propiedad del carbono de formar enlaces simples, dobles o triples con otros átomos de carbono.

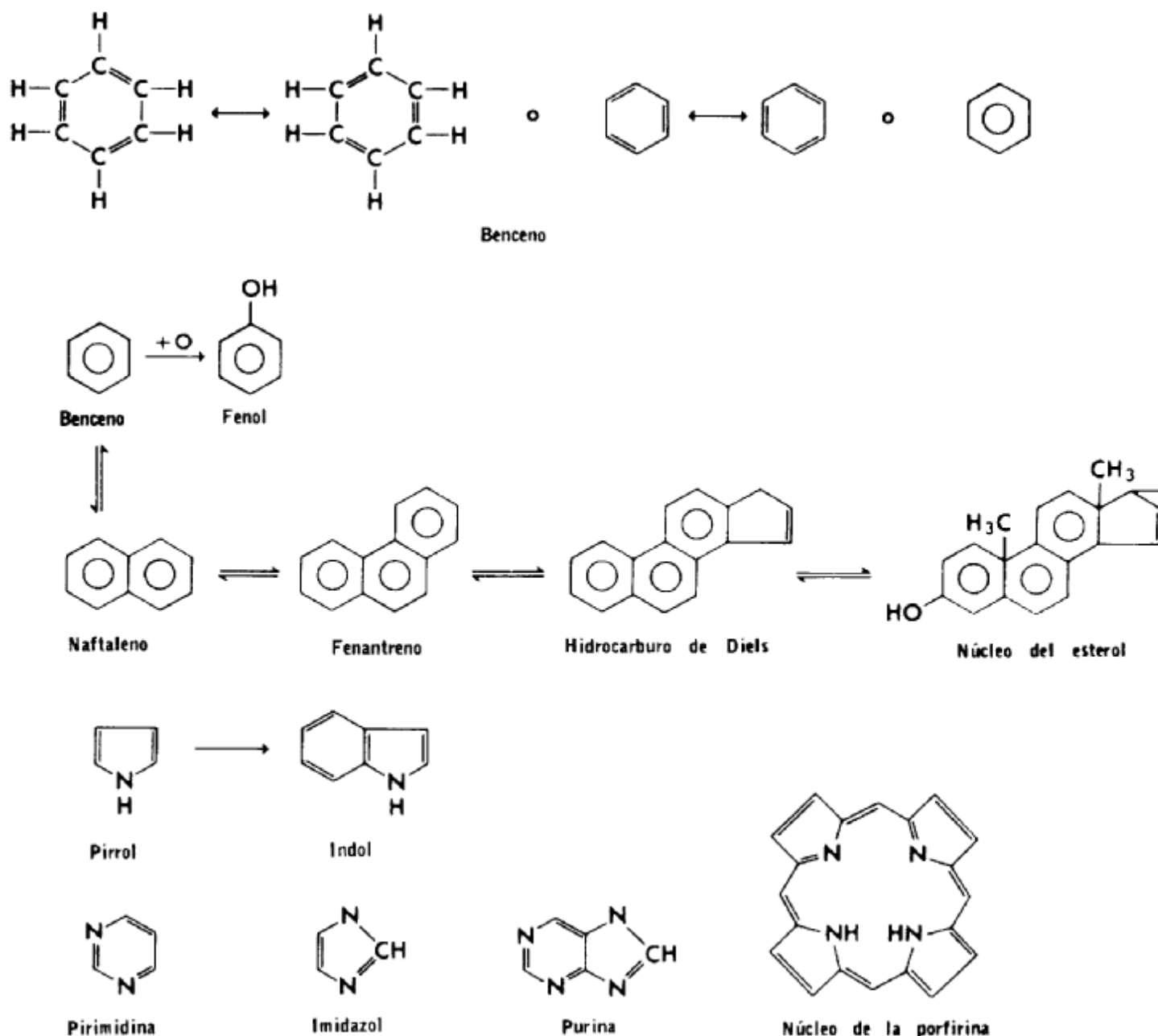


Fig. 6-2. Grupos aromáticos principales

Puesto que las largas cadenas de carbono son estables, es posible, para los compuestos de carbono formar cadenas rectas o ramificadas, anillos, redes y combinaciones de estas estructuras.

Los dos conjuntos de propiedades discutidos anteriormente, son compartidos por separado, respectivamente, por el carbono con los miembros de las mismas filas horizontales y verticales en la tabla periódica. Sin embargo, el carbono es el único elemento que posee ambos conjuntos de propiedades: la lenta reactividad y la casi infinita versatilidad. Uno se encuentra obligado a concluir que el carbono es verdaderamente un elemento único y es imposible que un *bios* basado en otro elemento diferente, pueda evolucionar en el universo.

Discutiremos brevemente la química de las pequeñas moléculas orgánicas de la célula. El material viviente es una fuente rica de compuestos orgánicos que reflejan la interminable variabilidad de las especies microbianas, vegetales y animales, pero debemos restringir nuestra atención solamente a unos cuantos de los más importantes compuestos encontrados universalmente en la materia viviente.

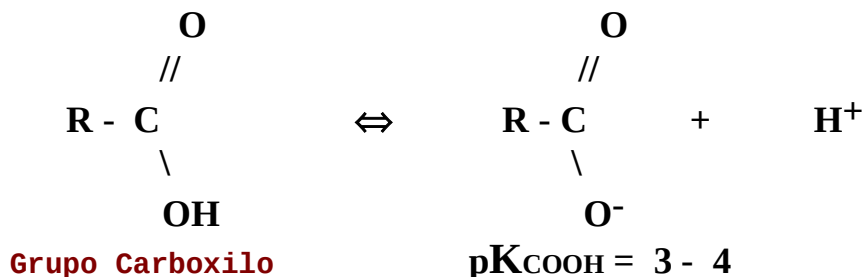
AGRUPAMIENTOS QUIMICOS

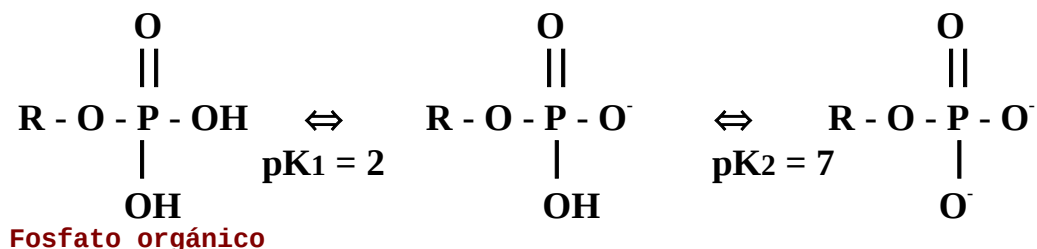
Las Figs. 6-1 y 6-2, son diagramas que muestran los grupos orgánicos principales encontrados en el material viviente. Los carbohidratos, las grasas, las bases de nitrógeno, los aminoácidos y otros compuestos son combinaciones de estos agrupamientos. Las flechas en los diagramas no indican necesariamente pasos por medio de los cuales se pueden sintetizar estos compuestos sino, simplemente, señalan las relaciones de familia. Las propiedades químicas y físicas de cada grupo, son la materia base de la química orgánica y se remite al estudiante a un libro de texto de química orgánica elemental para un estudio más detallado.

Antes de comenzar a enumerar algunas estructuras importantes biológicamente, debemos hacer mención de unos cuantos fenómenos que son importantes en la química orgánica de los sistemas vivientes.

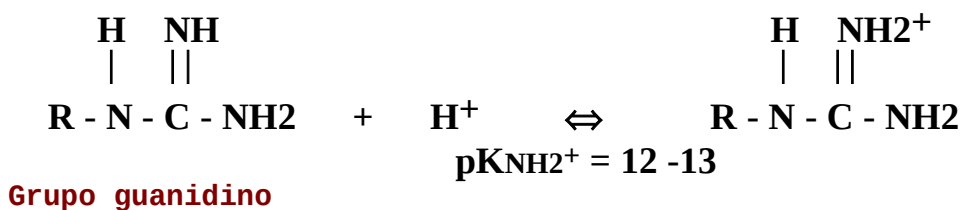
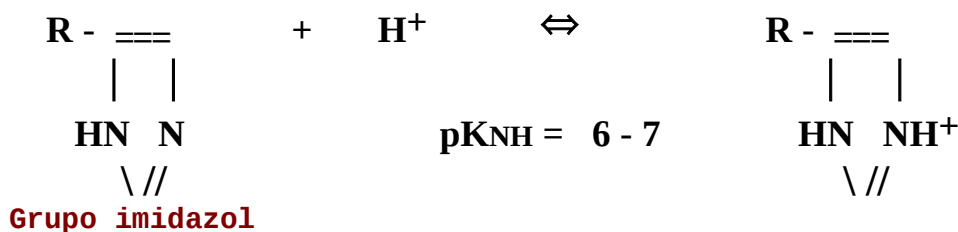
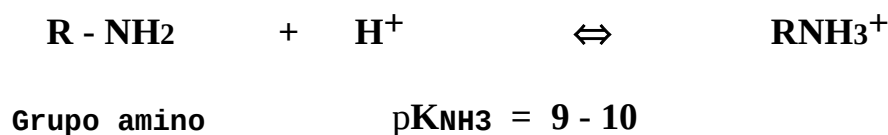
Disociación

Los principales ácidos orgánicos de la célula son los ácidos carboxílicos y los fosfatos orgánicos.



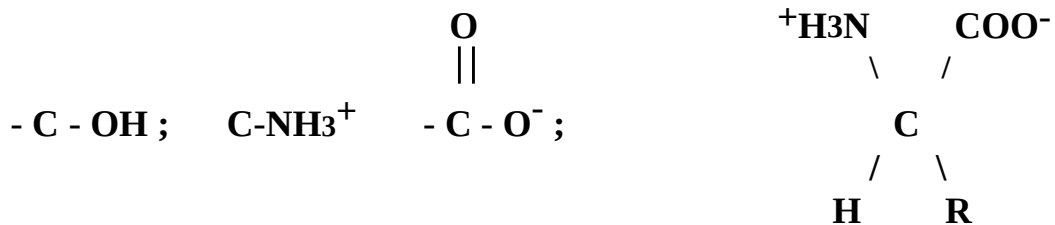
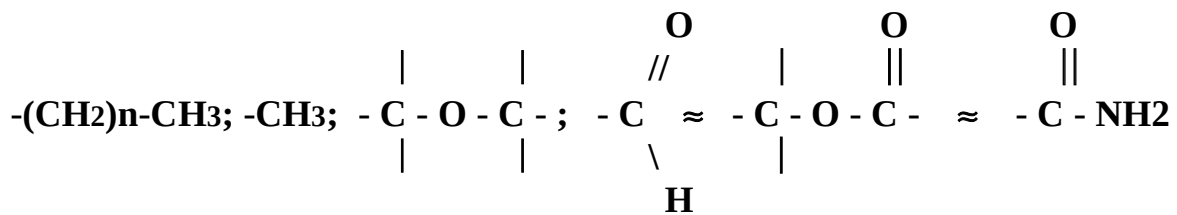


Las principales bases orgánicas de la célula son los compuestos que contienen nitrógeno.



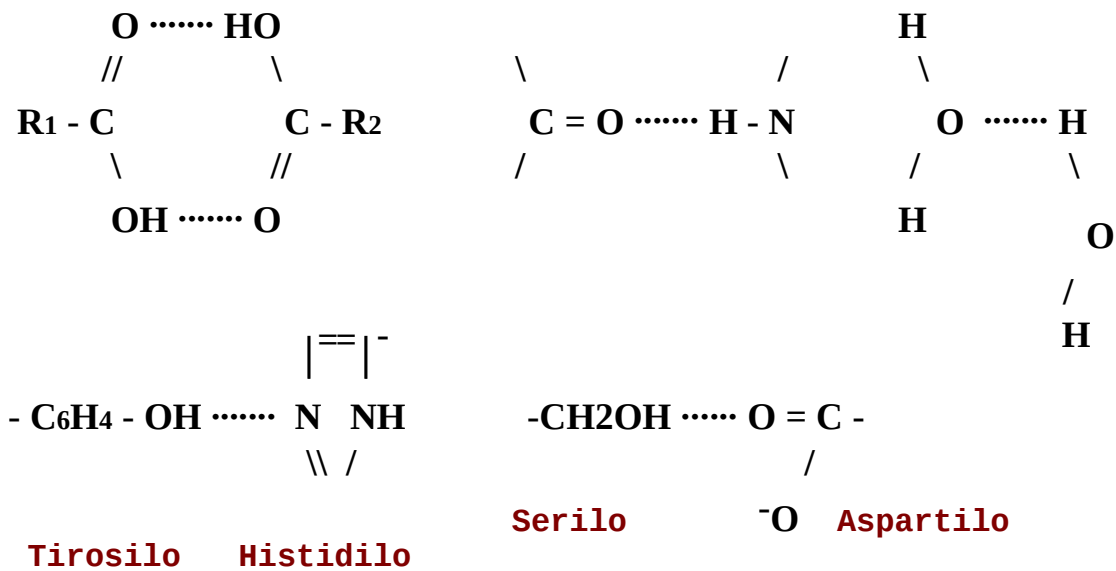
Solubilidad

Los grupos orgánicos pueden clasificarse como hidrofílicos si activan la solubilidad en solventes acuosos e hidrofóbicos si lo hacen en solventes orgánicos "no polares" como el benceno, el tolueno, etc. Los grupos hidrocarburos como el CH₃, C₂H₅, y el C₆H₅ son altamente no polares y, por consiguiente, hidrofóbicos, en tanto que los grupos disociados como el COO⁻, el NH₃⁺, son fuertemente polares y, por lo mismo, hidrofílicos. Entre estos dos extremos queda un número de grupos que les proporciona a sus respectivos compuestos una solubilidad intermedia. La siguiente lista es una aproximación burda, en orden ascendente, de las propiedades hidrofílicas de varios agrupamientos orgánicos.



Enlaces de hidrógeno

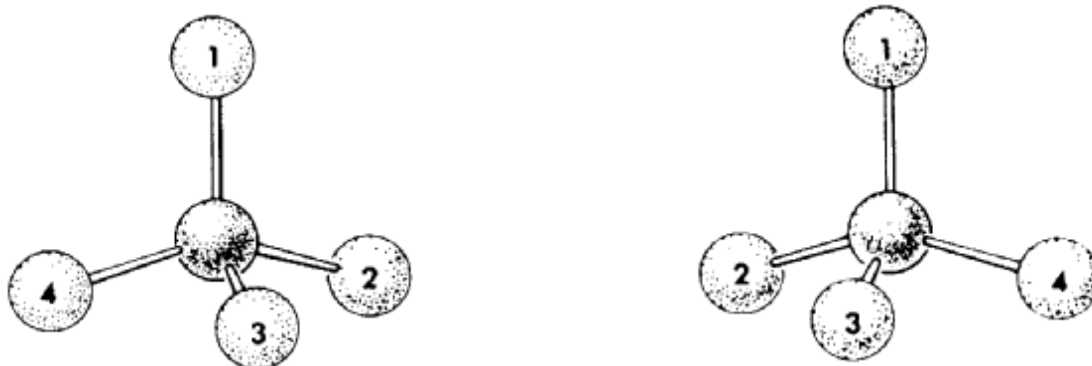
Como ya hemos dicho, los enlaces de hidrógeno son fuerzas de valencia secundaria débiles entre el hidrógeno y átomos fuertemente electronegativos como el F, O o N.



Los ejemplos anteriores de enlaces de hidrógeno (líneas punteadas), se encontrarán frecuentemente en las discusiones subsecuentes. La formación del enlace de hidrógeno juega un importante papel en la solubilidad de los compuestos orgánicos en solventes acuosos.

Isomerismo óptico

Cuando un átomo de carbono está unido a cuatro grupos diferentes, se forman dos posibles configuraciones espaciales distintas que se encuentran relacionadas una con la otra como un objeto con su imagen en un espejo.



una solución de uno de los miembros de este par de imágenes hace rotar el plano de la luz polarizada. Su isómero óptico hará lo mismo, pero la rotación será en dirección opuesta.

Absorción de la luz ultravioleta

Varios compuestos orgánicos de importancia biológica, carecen de color a la luz visible pero la absorben intensamente cerca del rango del ultravioleta. Esta absorción se debe a que los fotones de la luz ultravioleta excitan a los electrones de la molécula a niveles superiores de energía, por lo cual se dice que están en un "estado excitado". Tales "moléculas en estado excitado" son generalmente de tan corta vida, que no pueden reaccionar químicamente sin que antes entreguen su energía a las moléculas que las rodean. Sin embargo, en la fotosíntesis, y en otros importantes procesos biológicos, la energía de los estados excitados se emplea para efectuar reacciones bioquímicas importantes.

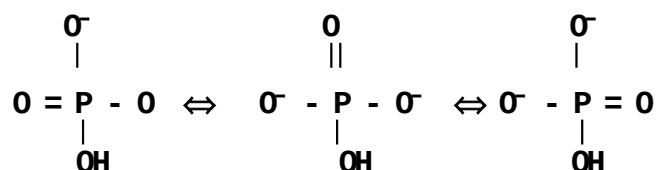
La facilidad con que un electrón en una molécula determinada puede ser excitado, depende de la estructura de la misma. Los compuestos sin doble o triple ligadura requieren, generalmente, considerable energía para la excitación del electrón y la absorben en la región ultravioleta más lejana, en donde la longitud de onda es más corta y, por lo tanto, la energía es más elevada. Los compuestos que contienen enlaces múltiples, particularmente aquellos en los cuales dos o más enlaces múltiples están adyacentes, absorben cerca de la región ultravioleta o en el rango de la visible. Ejemplos biológicos importantes de tales moléculas son las bases de nitrógeno de los ácidos nucleicos (Cap. 7) y los aminoácidos tirosina, triptofano y fenilalanina (Cap. 8). La absorción ultravioleta proporciona una herramienta conveniente para la medición de la concentración de estos importantes compuestos.

Afortunadamente para el biólogo, el máximo de absorción, para los ácidos nucleicos, se encuentra en 260 nm y para los tres aminoácidos en 280 nm.

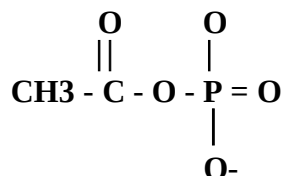
COMPUESTOS DE FOSFATOS DE ELEVADA ENERGIA

Se ha dado el nombre de fosfatos de elevada energía a aquellos ésteres de fosfato cuya hidrólisis conduce a una liberación elevada de energía bajo la forma de calor. Entre estas sustancias se encuentran algunas que trataremos más adelante, tales como el trifosfato de adenosina (TFA), los trifosfatos de uridina, citidina y guanosina (TFU, TFC, TFG), la fosfocreatina, el ácido fosfoenolpirúvico, los adenilatos de aminoácidos y el difosfato de uridínglucosa. Por ejemplo, la hidrólisis del TFA conduce a valores de ΔH (véase Cap. 2) de aproximadamente 9 000 calorías por mol, en tanto que otros compuestos, como el fosfato-6-glucosa, tienen valores de ΔH de aproximadamente la mitad de éste. En realidad, el contenido de elevada energía del compuesto está dado más correctamente por la energía libre de la hidrólisis, el ΔF (véase Cap. 2). Los valores de ΔF se obtienen de las medidas de las concentraciones de los compuestos de elevada energía en las reacciones en las cuales participan; son una medida de diferencias entre las energías libres de los reactantes y de los productos. Si la última es más elevada, entonces debe aportarse energía para que se produzca la reacción. No se conocen con exactitud las causas de la naturaleza de la "elevada energía" de estos compuestos, pero se cree que son debidas a varios factores que hacen a estos compuestos únicos: existen sorprendentes diferencias entre los compuestos y los productos de su hidrólisis, así como en sus estabilidades de resonancia, sus ionizaciones y las repulsiones electrostáticas intramoleculares. Lipmann y Kalckar, en 1941, observaron que una característica notable de los compuestos de elevada energía es que son anhídridos del ácido fosfórico con un segundo ácido, como un sustituto del ácido fosfórico, para formar los di y trifosfatos de nucleósido; o con un compuesto del ácido carboxílico (ácido acético), para formar el acetilfosfato; o aun con un enol, para formar el ácido fosfoenolpirúvico. Sin embargo, en otras ocasiones, el ácido fosfórico se combina con un compuesto de nitrógeno básico, como en la fosfocreatina. En todos los casos, la formación del enlace anhídrido reduce el número de grupos resonantes en la molécula y puesto que la estabilidad termodinámica de una sustancia aumenta con su capacidad para adquirir muchas formas resonantes, los compuestos de elevada energía son menos estables y sus hidrólisis producirán gran cantidad de calor. La Fig. 6-3 muestra algunas de estas propiedades.

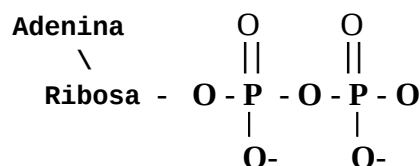
1. Formas resonantes de Fosfatos Inorgánicos.



2. Anhídrido de fosfato-carboxilado como en el acetilfosfato.



3. Anhídrido fosfato-fosfatado como el di y trifosfato de nucleósido.



4. Ligadura fosfato-nitrógeno básico. como en la fosfocreatina

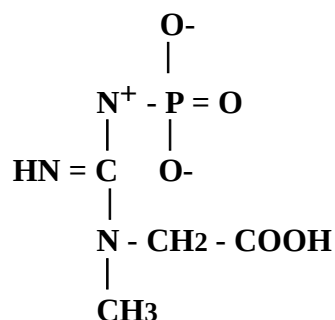


Fig. 6-3. Propiedades de compuestos de "elevada energía"

El compuesto más importante de elevada energía es el TFA. En la Fig. 6-4 se muestra su fórmula y en los Caps. 11 y 14 se dan las diversas maneras de su formación por la célula. Puede reaccionar de varias formas: (1) como un agente fosforilante, transfiriendo pirofosfato inorgánico a un aceptor, como en la reacción de la hexoquinona para formar el fosfato-6-glucosa (Fig. 10-1); (2) como agente fosforilante, transfiriendo pirofosfato inorgánico a un aceptor; o (3) como un adenilante, transfiriendo la mitad del adenilato a un aceptor adecuado, como en la formación de los adenilatos de aminoácidos (Fig. 13-4). En todos estos casos, el producto sintetizado puede estar a un nivel de energía inferior, igual o aun superior que el del TFA. En la célula, el TFA funciona principalmente como un agente fosforilante en todos aquellos casos en que se necesita energía para dirigir una reacción. El TFA actúa como un mensajero entre las reacciones que proporcionan energía (exergónicas) y las que utilizan energía (endergónicas); lo hace así porque puede actuar en ambos tipos de reacciones. De igual manera, los otros difosfatos de

nucleósidos: guanílico, citidílico y uridílico, pueden fosforilarse con el TFA para dar los correspondientes trifosfatos.

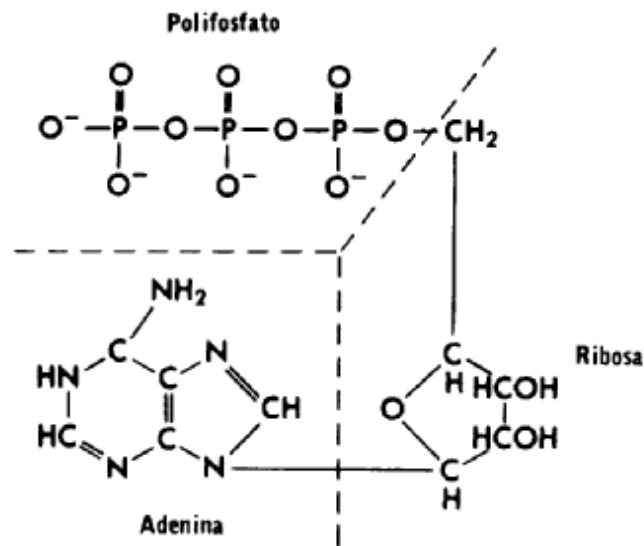


Fig. 6-4. Fórmula química del TFA

Estas reacciones son importantes ya que todos los trifosfatos de nucleósidos son instrumentos en las reacciones de síntesis. El TFA entra en la síntesis de los ácidos grasos y en la síntesis de las proteínas (véase Cap. 13); el TFC en la síntesis de los fosfolípidos; el TFU, en la del glucógeno (véase Cap. 14); y el TFG, en la síntesis de los carbohidratos y de las proteínas. El último requisito de energía para las necesidades de síntesis de la célula, está en el TFA, ya que solamente éste se forma en las fosforilaciones glicólica (véase Cap. 14) fotosintética y de oxidación (véase Cap. 11). Pero del TFA, la energía se canaliza, por medio de incontables reacciones de transfosforilaciones, a otros compuestos "donadores de energía". Por ejemplo, el glucógeno se forma a partir del DFAG, un compuesto que se sintetiza en la reacción del TFU con el fosfatoglucosa; el TFU se forma del TFA a través de la reacción $\text{TFA} + \text{DFU} \rightleftharpoons \text{DFA} + \text{TFU}$. Además, el TFA puede fosforilar a la creatina, formando la fosfocreatina utilizada en las fibras musculares (véase Cap. 14). También puede fosforilar al acetato, dando el acetilfosfato, o puede transferir la mitad de su adenilato al acetato, formando el acetiladenilato. Estos dos compuestos pueden transformarse en la acetilcoenzima A, la cual es la precursora inmediata de los ácidos grasos. En la Fig. 6-5 se dan las interconversiones entre las diferentes clases de compuestos del fósforo. El problema presentado por tales esquemas es de cómo la célula puede regular, a través de los cambios de los grupos de alta energía,

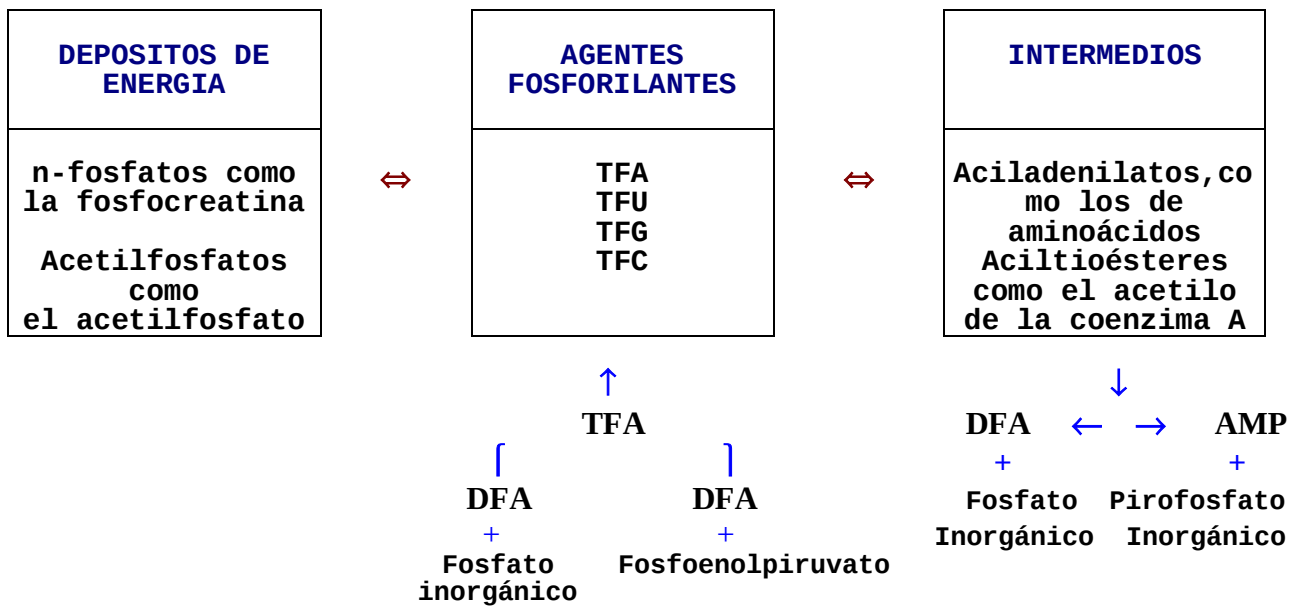


Fig. 6-5. Interrelaciones entre los compuestos de "elevada energía"

las innumerables reacciones de síntesis que tienen lugar dentro de ella. En algunos casos, como el estado de energía del compuesto aceptor fosforilado es el mismo que el del TFA, o menor, parecería que la disponibilidad del compuesto aceptor, sea éste DFU o glucosa, se emplearía como un medio regulador. En otras ocasiones, como sucede en el caso de la fosfocreatina o del aciladenilato, el contenido de energía es más alto que el del TFA; entonces la reacción no iría en la dirección de la síntesis del compuesto aceptor fosforilado, a menos que la concentración del último compuesto sea reducida, utilizándolo todavía en otra reacción aparte de la síntesis. De esta manera, la energía es empleada en la reacción de síntesis; el fosfato o el pirofosfato se rompe, y la reacción completa, a partir del TFA, será en la dirección de la síntesis del fosforilado intermedio, y por lo tanto, en la dirección de la síntesis del glucógeno, de la proteína, o de cualquier otro que sea el caso.

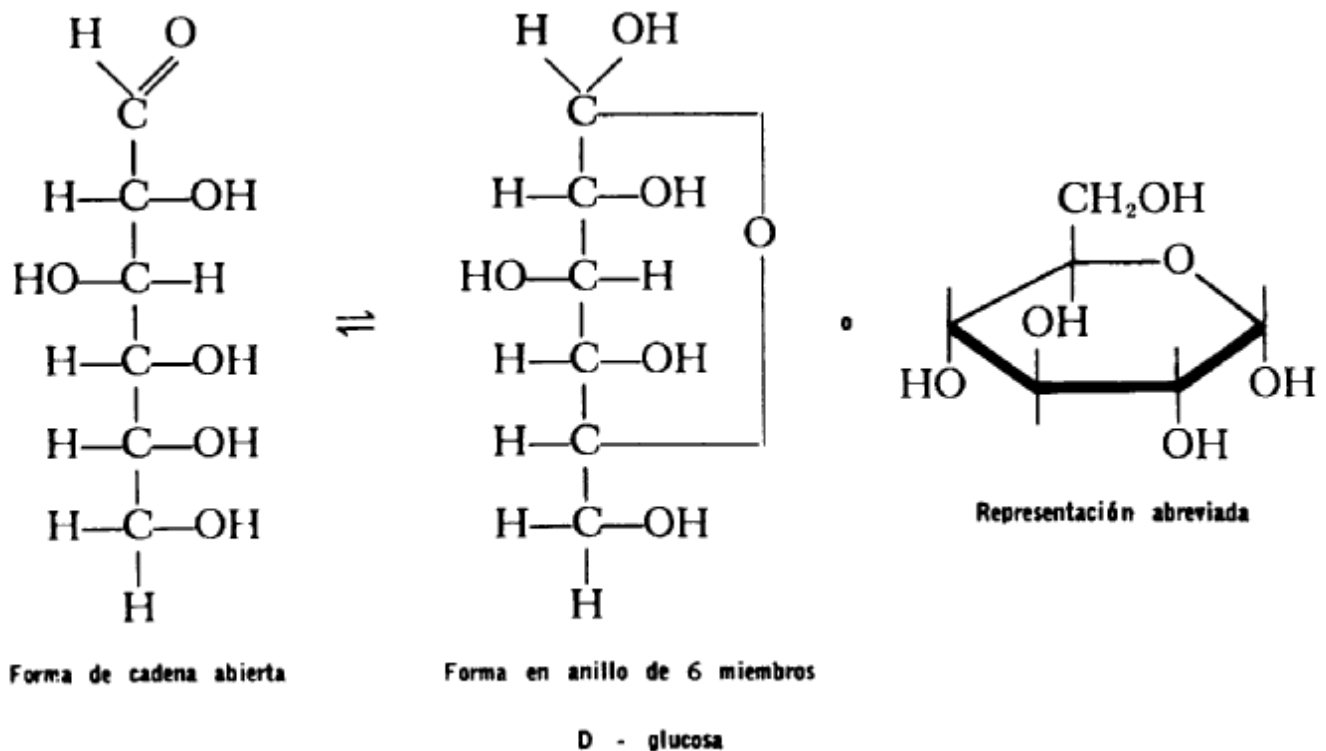
ESTRUCTURAS ORGANICAS

Los compuestos orgánicos de la célula frecuentemente se clasifican en cinco categorías: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, y "otros". En este capítulo nos restringiremos a ejemplos solamente de la primera y de la segunda categorías.

Carbohidratos

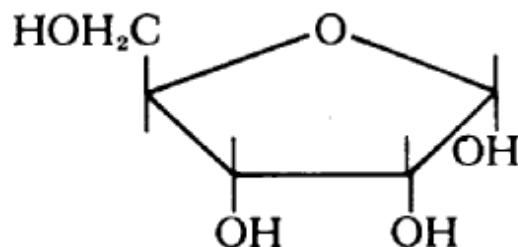
Los carbohidratos son un grupo de compuestos caracterizados por tener la fórmula general $(CH_2O)_n$.

La d-glucosa, una hexosa, es el azúcar de 6 carbonos más ampliamente extendido en el mundo viviente. Tiene cinco grupos hidroxilos y un grupo aldehído. En solución se le encuentra principalmente en la forma de un anillo de 6 miembros que está en equilibrio con una pequeña cantidad de la forma de cadena abierta. La forma en anillo (piranosa) origina que el grupo aldehído sea relativamente poco reactivo.



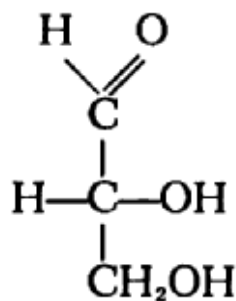
Puesto que la glucosa tiene cuatro átomos de carbono asimétricos, tiene 16 isómeros, de los cuales solamente tres se encuentran en la naturaleza. A causa de la abundancia de los grupos hidroxilo con enlaces de hidrógeno, la glucosa es muy soluble en agua.

La d-ribosa es un azúcar de cinco carbonos (pentosa), que veremos es extremadamente importante en la química de la herencia (ya que es un componente del ADN y del ARN) y en el metabolismo de la transferencia de energía (puesto que es una parte constitutiva del TFA). Su derivada es la desoxirribosa.



D-ribosa

El d-gliceraldehído es un importante intermediario en el metabolismo anaeróbico de los carbohidratos (véase el Cap. 14).



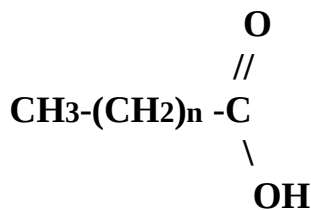
D-gliceraldehído

Las hexosas y las pentosas pueden polimerizarse en cadenas rectas o ramificadas de variable longitud para formar polisacáridos, los cuales son materiales estructurales como la celulosa o productos de almacenamiento como el almidón (en las plantas) o el glucógeno (en los animales).

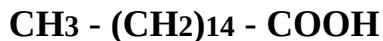
Lípidos

Los lípidos no están relacionados, necesariamente, en una estructura química, ya que están definidos por su propiedad física común de solubilidad en solventes orgánicos no polares.

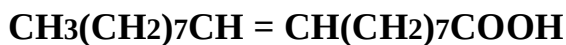
Ácidos grasos de la variedad "saturada", tienen la siguiente fórmula general.



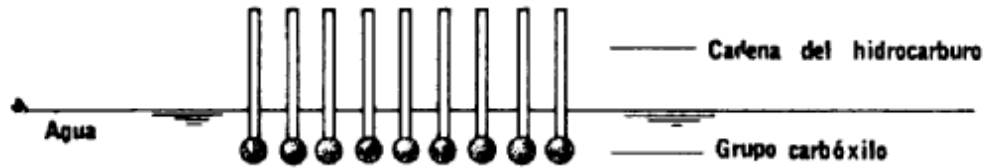
Un ejemplo típico es el ácido palmítico



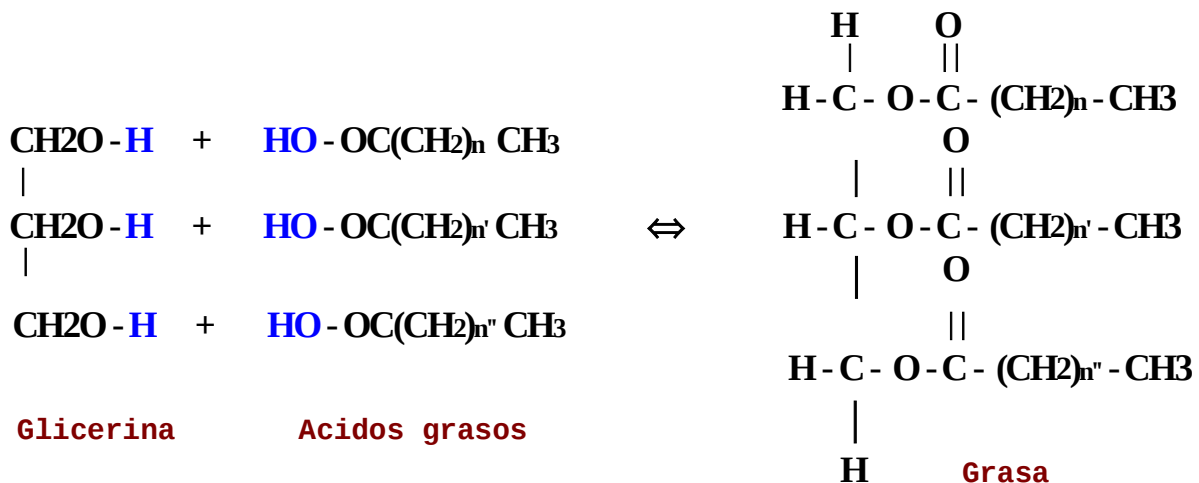
Los ácidos grasos no saturados tienen uno o más enlaces dobles. Por ejemplo, el ácido oleico, que posee solamente un enlace de esta naturaleza, tiene la siguiente fórmula



Los ácidos grasos tienen la propiedad especial de estar compuestos de una cadena bastante no polar e hidrofóbica de hidrocarburos, y un grupo carboxilo disociado muy polar. Esto origina que el ácido graso forme una capa orientada monomolecular en una interfase de agua, un efecto que baja considerablemente la tensión superficial del agua.



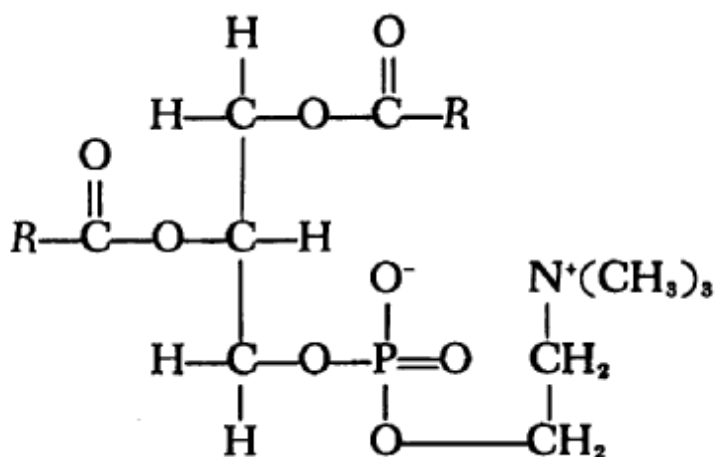
Esto explica el poder de desengrase de los jabones que son sales de potasio y sodio de ácidos grasos. Las grasas son ésteres del glicerol y de los ácidos grasos.



Debido a que los grupos carboxilos polares están unidos en las grasas en forma de ligaduras éster, mucho menos polares, las grasas son altamente insolubles en agua.

Los fosfolípidos son ésteres del glicerol (glicerina) y uno o dos ácidos grasos, que contienen, además, algunos compuestos de nitrógeno y fósforo.

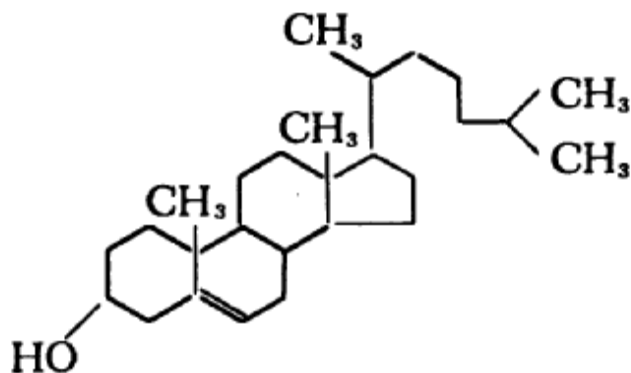
La fórmula es la de una lecitina que contiene ácido fosfórico y una base de nitrógeno llamada colina. A causa de las dos cargas en un extremo y las características no polares en el otro, los fosfolípidos tienden a ser muy activos de superficie. Se encuentran en la célula como componentes estructurales de las membranas semipermeables.



Lecitina

Los esteroides son lípidos que se derivan de una estructura de fenantreno, por lo cual son muy diferentes en su constitución química de los ácidos grasos, de las grasas y de los fosfolípidos. Los esteroides se encuentran como componentes estructurales de las membranas y también como hormonas, y en este caso desempeñan un importante papel en la regulación fisiológica del metabolismo animal.

El colesterol es un esteroide bien conocido y ampliamente distribuido.



Colesterol

Las bases de nitrógeno y los aminoácidos son los materiales de construcción de los ácidos nucleicos y de las proteínas, respectivamente, y se tratarán, por lo tanto, en los dos capítulos siguientes. Otros compuestos, tales como los ácidos orgánicos, los intermediarios fosforilados, etc., se discutirán en los Caps. 10 y 11.

Hemos tratado aquí de las moléculas pequeñas más importantes de la célula. Más adelante aprenderemos algo del papel que desempeñan en el "flujo metabólico" que es tan característico del mundo viviente.

Como hemos visto en el Cap. 3, la célula no es una gotita de líquido conteniendo una mezcla de pequeñas moléculas en solución. Es, más bien, materia en un *estado coloidal de agregación*, poseyendo tanto las propiedades elásticas de un sólido como las propiedades viscosas de un líquido. Además, la célula no está hecha de un solo material "protoplasma", sino que está formada por organelas suspendidas en una sustancia base, que está entrelazada por una malla de membranas hidrofóbicas. Ciertamente, la célula tiene una fina e intrincada estructura dentro de la cual el flujo metabólico de las pequeñas moléculas es regulado delicadamente. Los materiales de construcción que dan origen a esta fina estructura, son las macromoléculas de la célula, los ácidos nucleicos y las proteínas. Es, por lo tanto, importante, a fin de comprender la estructura y la función de las organelas celulares, estudiar con más detalle la química estructural de las macromoléculas celulares.

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

BALDWIN, E., 1957. *Dynarnic aspects of biochemistry*, 3ded. Cambridge: Cambridge University Press.

Fruton, J. S., and Simmons, S., 1958. *General biochemistry*, 2d ed. New York: Wiley.

CAPITULO SIETE

LOS ACIDOS NUCLEICOS, PORTADORES DE INFORMACION BIOLOGICA

La historia de la ciencia frecuentemente, se la representa como un proceso en una sola dirección, de una percepción que constantemente se ensancha y se profundiza dentro de la unidad de la naturaleza. Pero la ciencia es también una actividad humana y su progreso revela mucho acerca de la mente y del espíritu del hombre. Ilustra su capacidad para despojarse a si mismo de prejuicios; su disposición para aceptar la soledad que sobreviene a través de una separación de la corriente principal del pensamiento humano; su habilidad para comunicarse con provecho con sus semejantes a través de barreras nacionales y aun ideológicas. Este significado humanístico de la ciencia puede comprenderse mejor cuando examinamos las biografías de los más extraordinarios profesionales. Uno de ellos fue **Friedrich Miescher** (1844-1895) el cual anticipó un enfoque de la biología celular que ha venido verificándose solamente durante los últimos veinte años. En 1868, Miescher se impuso la tarea de estudiar la química del núcleo. En ese tiempo, la importancia del núcleo era escasamente comprendida, pues fue hasta 1876 cuando **Oskar Hertwig** demostró que la fecundación del erizo de mar comprendía la fusión de dos núcleos, uno procedente del óvulo y el otro del esperma. Varios pensadores, incluyendo a **Leonardo da Vinci** (1452-1519), habían señalado anteriormente que, puesto que la herencia resulta de determinada unión y no se afecta por la dirección en la cual se haga el cruzamiento, tanto el macho como la hembra, por lo tanto, debían contribuir por igual a la herencia de la descendencia. Miescher debió estar al tanto de esto como también del hecho de que el esperma consiste, casi en su totalidad, de material nuclear. Debió haber hecho conjeturas, aun antes de las observaciones de Hertwig de la fusión nuclear, de que el núcleo es el depósito de los hechos hereditarios. Provisto de esta brillante y profética conjetura, Miescher enfocó su problema en una forma que se adelantó medio siglo a sus contemporáneos. Para empezar, él supuso que el fenómeno de la herencia debía tener una base química. Segundo, escogió un material biológico muy adecuado para el aislamiento del núcleo: las células de pus, obtenidas de las vendas de desecho de las heridas de los soldados, con las cuales contaba en abundancia debido a la Guerra Franco-Prusiana.

Tercero, empleó una técnica asombrosamente moderna para romper con delicadeza a sus células: la digestión con ácido clorhídrico-pepsina, seguida de la extracción con éter que dejaba una capa de núcleos intactos en el fondo del tubo de ensayo. Así, sin el auxilio de la centrifugación diferencial, Miescher fue capaz de aislar, por primera vez, a una organela celular. Tratando al núcleo con una solución salina seguida de acidificación, Miescher obtuvo un material que tenía una propiedad observada, hasta entonces, solamente en algunas fracciones de lípidos: contenía grandes cantidades de fósforo. Miescher denominó a este material *nucleica*. Posteriormente se le denominó *ácido desoxirribonucleico* (ADN) y está reconocido, en la actualidad, como la estructura química en la cual se almacenan las características hereditarias de las células.

Miescher siguió su descubrimiento a través de muchos años con cuidadosa experimentación. Fraccionando las cabezas del espermatozoide del salmón del Rin a bajas temperaturas, fue capaz de demostrar que la nucleína era una sustancia de elevado peso molecular y que estaba asociada con una proteína inusualmente básica que denominó *protamina*. Su medida del contenido de fósforo de la "nucleína" (9.95%) corresponde con nuestros modernos valores del ADN (9.22 a 9.24%) y es un tributo a la excelencia de sus preparaciones. Cuando murió Miescher. Le dejó a su estudiante **Altmann** los firmes cimientos de un campo completamente nuevo en biología, que él, un solo individuo, había iniciado. Así nacieron nuestros conocimientos de la base molecular de la herencia, precisamente en el tiempo en que **Mendel** estaba descubriendo algunas de sus manifestaciones biológicas.

LA QUIMICA ORGANICA DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

Durante los cuarenta años que siguieron a la muerte de Miescher, se encontró la explicación de la química orgánica de los ácidos nucleicos. Se hizo aparente que existían dos clases de estos ácidos. El ácido desoxirribonucleico (ADN) se encontró que está compuesto de (1) las bases nitrogenadas de purina: *adenina* y *guanina*, (2) las bases nitrogenadas de pirimidina: *citocina* y *timina*, (3) el azúcar pentosa *desoxirribosa* y (4) el *ácido fosfórico* (Fig. 7-1). El *ácido ribonucleico* (ARN) se encontró que está compuesto de los mismos materiales de construcción excepto que el *uracilo* de la pirimidina sustituye a la timina y la pentosa *ribosa* a la *desoxirribosa* (Fig. 7-1).

En los últimos veinte años, con el auxilio de enzimas especiales llamadas nucleasas que tienen la propiedad de romper ya sea al ADN o al ARN en diversos sitios específicos en su estructura macromolecular, ha sido posible encontrar cómo estos materiales de construcción del ADN y del ARN, se encuentran colocados dentro de la molécula.

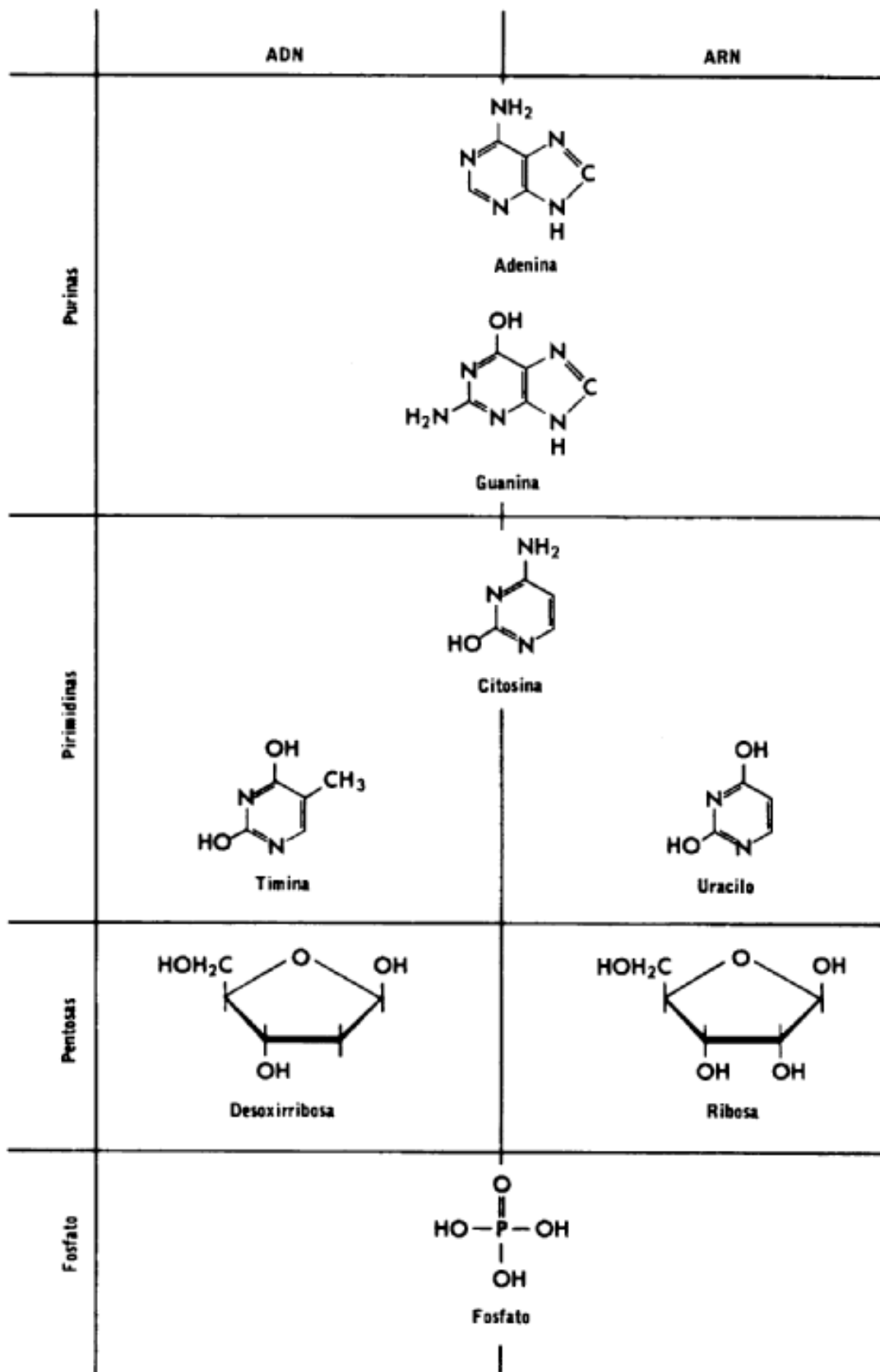
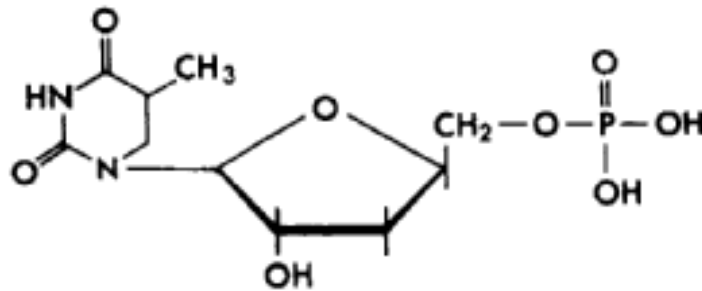


Fig. 7-1 Los materiales de construcción del ADN y del ARN



(_____)

Timina
una pirimidina

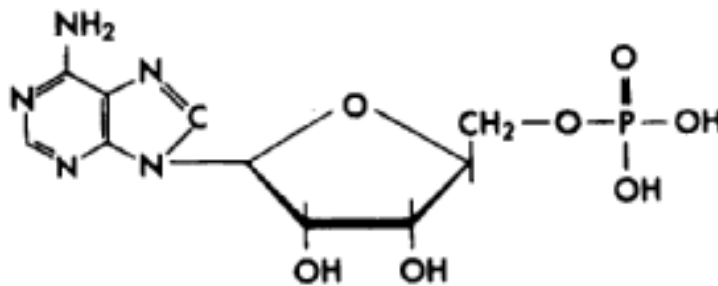
(_____)

Timidina
un nucleósido de pirimidina

(_____)

Monofosfato de timidina
un nucleótido de pirimidina

Un nucleótido de ADN



(_____)

Adenina
una purina

(_____)

Adenosina
un nucleósido de purina

(_____)

Monofosfato de adenosina
un nucleótido de purina

Un nucleótido de ARN

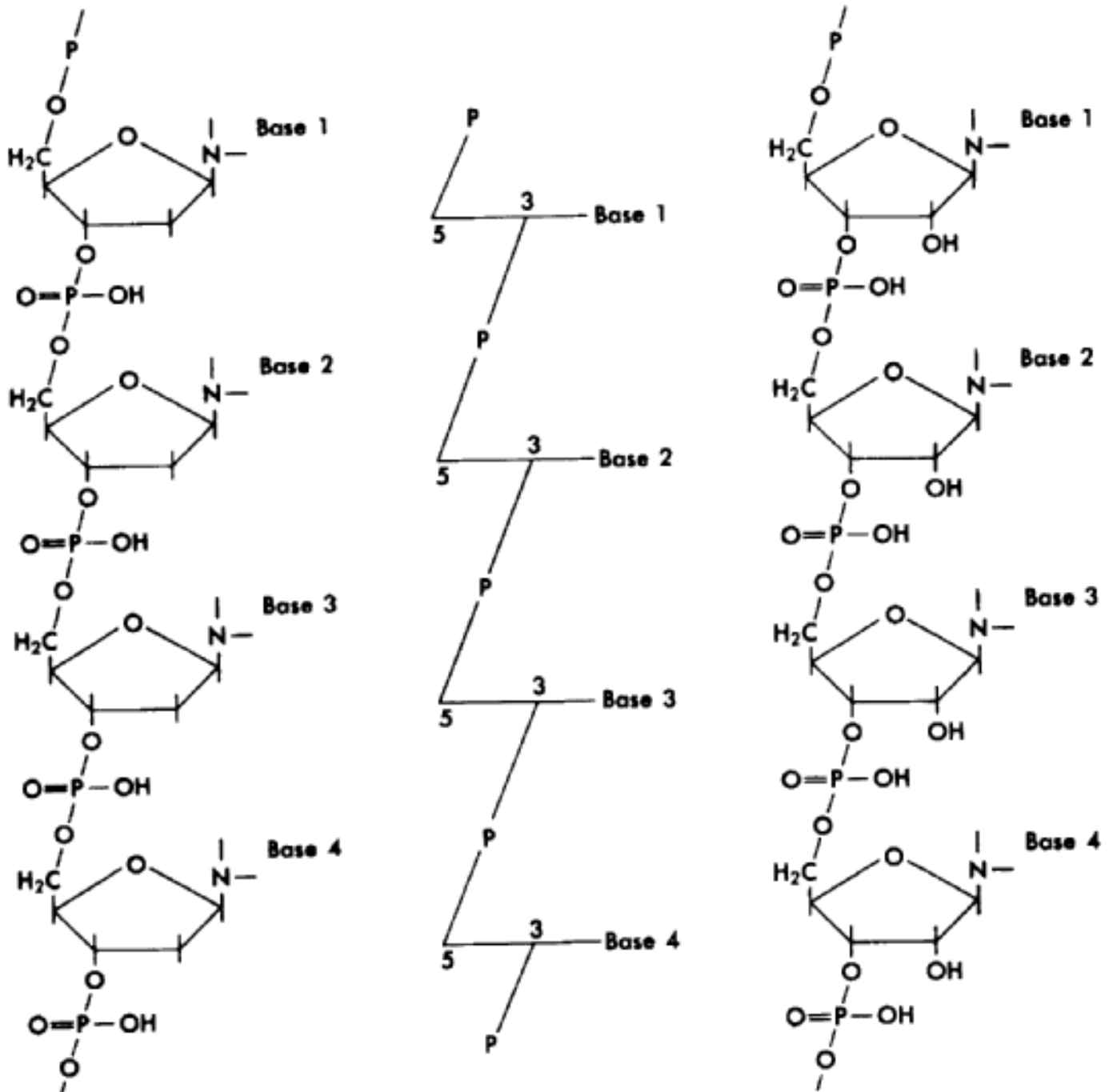
Fig. 7-2. El nucleótido, subunidad fundamental de los ácidos nucleicos

Tanto en el ADN como en el ARN, las bases nitrogenadas de la purina y de la pirimidina se encuentran ligadas a la desoxirribosa o a la ribosa respectivamente, para formar nucleósidos (Fig. 7-2), en tanto que el fosfato está unido a los azúcares para dar lugar a los nucleótidos.

¿Cómo se encuentran unidos los nucleótidos en el polímero? Conocemos ahora, a través de muchos hechos evidentes separados, que tanto el ADN como el ARN son polímeros lineales, no ramificados, de nucleósidos ligados por medio de grupos de fosfato. Las bases nitrogenadas, como mostramos en la Fig. 7-2, se encuentran unidas a las unidades de pentosa. La Fig. 7-3 representa cadenas de muestra o "polinucleótidos" del tipo del ADN y del ARN.

INDICACIONES DE LA FUNCION BIOLOGICA

En tanto que estas laboriosas investigaciones sobre la química orgánica de los ácidos nucleicos estaban en progreso, un gran número de investigaciones importantes condujeron al esclarecimiento de su función biológica. En los Caps. 12 y 13 y en la *Genética* de esta serie, se discuten los más recientes descubrimientos en este campo. No trataremos aquí de las técnicas por medio de las cuales se hizo la separación del ADN y del ARN, uno del otro y de otros constituyentes de la célula, como las proteínas. Baste decir que todos los descubrimientos químicos y biológicos quedaron cimentados precisamente en los avances hechos en el área de la purificación.



Polinucleótido del ADN

Forma esquemática
de los polinucleótidos
del ADN y del ARN

Polinucleótido del ARN

Fig. 7-3. Estructura de los polinucleótidos del ADN y del ARN

De igual importancia fue el saber que el ADN reacciona con el reactivo de Schiff para dar un brillante color púrpura (la reacción de Feulgen), que tanto el ADN como

el ARN reaccionan con los colorantes básicos y que ambos absorben la luz ultravioleta con gran intensidad en la región de los 240 a los 280 mμ con una absorción máxima, proximada a los 260 nm, (Fig. 7-4). Al analizar estos descubrimientos, se desarrollaron un gran número de métodos ingeniosos para localizar al ADN y al ARN en la célula. **Carspersson** desarrolló microscopios de luz ultravioleta, microespectrofotómetros y varios métodos microquímicos diseñados para calcular el contenido de ácido nucleico en las partículas celulares.

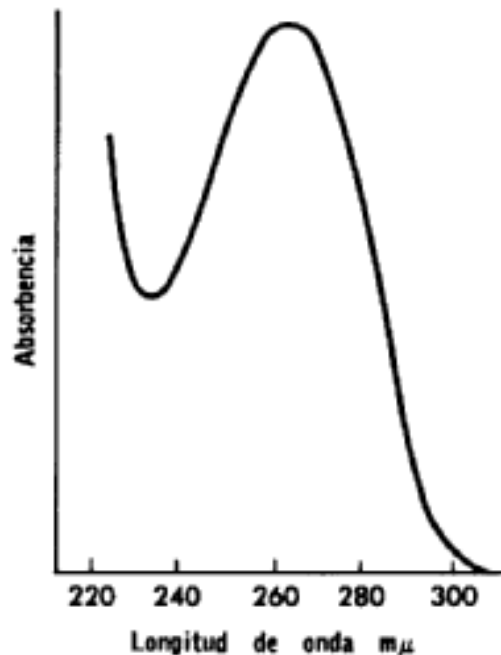


Fig. 7-4. Espectro de absorción de un ácido nucleico

De estos estudios hemos aprendido que (1) el ADN está localizado principalmente en los cromosomas aunque existen algunos informes que indican haberlo encontrado en los cloroplastos y aun en el citoplasma de los huevos, (2) que la mayor proporción de ARN se encuentra en el citoplasma y (3) que de la pequeña cantidad de ARN encontrada en el núcleo, una parte está localizada en el núcleo y el resto está asociado con los cromosomas o se encuentra libre en el jugo nuclear. Como veremos en el Cap. 13, la mayor parte del ARN citoplasmático se encuentra en los ribosomas.

Pero los experimentos más significativos que se han efectuado sobre el papel biológico de los ácidos nucleicos, se han hecho con los microorganismos. Puesto que estos experimentos se han examinado con algún detalle tanto en *Genética* como en la *Vida microbiana*, de esta serie, simplemente haremos una mención de ellos. (1) El aislamiento y purificación de muchos virus y la demostración de que estos sistemas autoduplicantes son la desoxirribonucleoproteína o la ribonucleoproteína. (2) El trabajo de **Avery**, **MacLeod** y **McCarty** que demuestra que el ADN extraído

de la cepa de neumococo S (capsulado) puede, completa y permanentemente, transformar células del tipo R (no capsulado) al tipo S. (3) El trabajo de **Hershey** y **Chase** que demuestra que durante la infección por virus, el ADN del virus T2 penetra en la célula bacteriana en tanto que la mayor parte de las proteínas del virus permanecen afuera. (4) El trabajo de **Fraenkel-Conrat** y **Schramm** mostrando que para el virus del mosaico del tabaco transportador de ARN, era únicamente éste solo el que determinaba las características especiales de una determinada cepa de virus. Así, por la mitad de la década de los cincuenta, estos y otros experimentos habían conducido a la creencia general de que el ADN es el material hereditario de la célula y que la síntesis de las proteínas se hace, hasta cierto punto, mediante el ARN. Puesto que el gen debe ser el último determinante de la especificidad de la proteína, se suponía que el metabolismo, tanto del ADN como del ARN, estaba relacionado. Trataremos en los Caps. 12 y 13 hasta qué punto estas predicciones de la década de los cincuenta, se ha comprobado que son esencialmente correctas. Aquí, sin embargo, examinaremos con más detalle la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos.

LA ESTRUCTURA DEL ADN

Sabemos, hasta este punto, que el ADN y el ARN son polinucleótidos que forman largas cadenas sin ramificaciones. Este conocimiento no nos dice, sin embargo, cómo estas moléculas están organizadas tridimensionalmente. Como veremos una y otra vez, la configuración precisa tridimensional de las macromoléculas biológicas es de suma importancia para comprender su función biológica, y es en este campo de la biología celular donde han tenido lugar los más sorprendentes descubrimientos durante la década pasada.

En 1950, **Chargaff** señaló que en el ADN, la cantidad de adenina es igual a la de timina y la de guanina es igual a la de citosina. Al mismo tiempo Wilkins y un gran número de otros investigadores en Inglaterra, obtuvieron medidas exactas efectuadas sobre fibras "tejidas" procedentes del ADN, utilizando el método de la difracción de los rayos X. Este método tan poderoso, el cual está desempeñando un papel cada vez de mayor importancia en la biología molecular, emplea la difracción de los rayos X para detectar la forma periódica o repetida en la estructura molecular o cristalina. Las mediciones del ADN mostraron que existe una forma repetida a intervalos de 28 a 34 Å. Estas dimensiones causaron verdadera extrañeza, puesto que nada en la estructura química, a lo largo de la longitud del polímero lineal, parecía corresponder con estas medidas: la distancia de un fosfato al siguiente es aproximadamente de sólo 7 Å.

Las mediciones físicas en soluciones de ADN de propiedades tales como la viscosidad y la dispersión de la luz, indican que la molécula del ADN es muy grande (pesos moleculares de 10^5 a 10^7) y tiene la forma de bastoncillos muy largos y tiesos.

Watson y Crick, cuando colaboraban en el Cavendish Laboratory, en Cambridge, Inglaterra, propusieron en 1953, una estructura para el ADN que satisfacía las observaciones anteriores. Empleando lo sabido hasta entonces acerca de las distancias de los enlaces y los ángulos de enlace en las moléculas orgánicas, construyeron un modelo a escala de la molécula del ADN. Se les ocurrió que de 28 a 34 Å repetidos en el modelo podían satisfacer a una espiral. Que la molécula era una doble espiral de dos espiras separadas de ADN, torciéndose una alrededor de la otra; les debió haber sido sugerido cuando consideraron la complementariedad de $A = T$ y $G = C$ descubierta por Chargaff. El modelo a escala de la espiral de doble espira que resultó, probó tener propiedades interesantes.

Primero, Watson y Crick señalaron que para tener la máxima simetría, las dos espiras debían ir en direcciones opuestas. Haciendo referencia a la Fig. 7-3, se observa que las espiras de ADN, no tomando en consideración el orden de las bases, no son las mismas si se leen desde la izquierda y desde la derecha.

Segundo, encontraron que la estructura de dos espiras está estabilizada por las bases de nitrógeno, que apuntan unas hacia las otras y son capaces de formar enlaces de hidrógeno. Se concluye que estos puentes que sostienen unidas las dos espiras de la doble espiral se pueden formar solamente entre purinas y pirimidinas, puesto que no hay espacio suficiente para dos purinas y existe demasiado para dos pirimidinas. Además, como se puede observar de la Fig. 7-5, los únicos pares de purina y pirimidina capaces de formar enlaces de hidrógeno son la adenina-timina

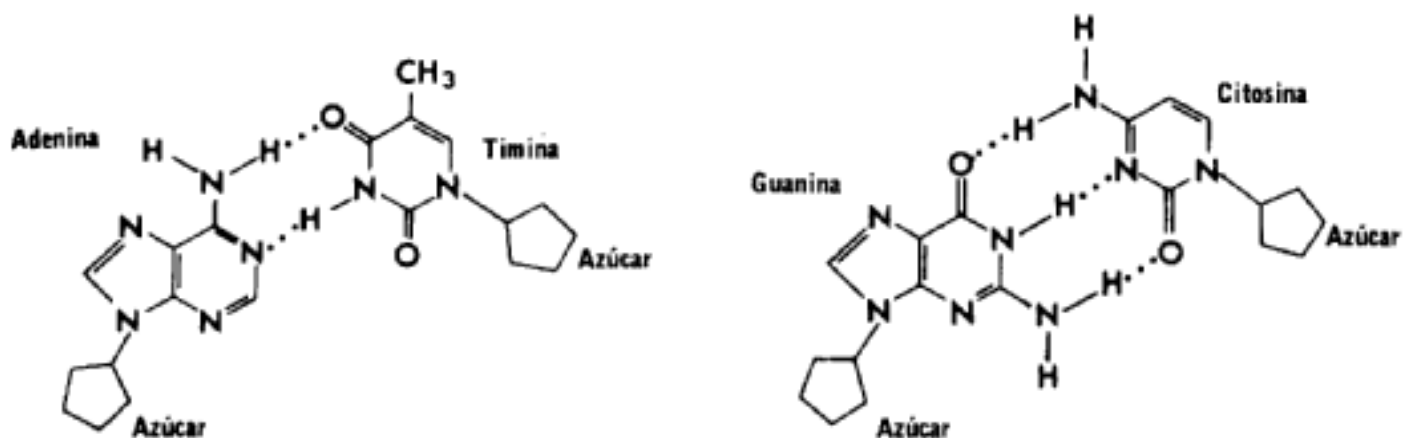


Fig. 7-5. Enlaces de hidrógeno entre adenina-timina y guanina-citosina

(dos enlaces de hidrógeno) y la guanina-citosina (tres enlaces de hidrógeno). Esta conclusión ha sido desde entonces sostenida por un conjunto abrumador de evidencias stereoquímicas y de otra clase y es una de las más excitantes en la historia de la biología. Así, la igualdad $A = T$, $C = G$ sugiere una doble espiral, esta doble espiral está construida de tal manera que uno encuentra que tiene las propiedades stereoquímicas de determinar únicamente la igualdad $A = T$, $C = G$.

Tercero, llega a ser claro que la naturaleza del modelo no pone restricciones en la secuencia de cómo se continúan uno al otro el par de bases. Así, parece que moléculas diferentes de ADN son idénticas en su arquitectura en general, difiriendo solamente en la secuencia específica de sus pares de bases.

La Fig. 7-6 muestra dos modelos del ADN de Watson-Crick de doble espiral. La primera ilustra el ahora famoso modelo geométrico básico de la "escalera de cuerda curvada con peldaños sólidos y muestra la posición de los bloques que construyen el armazón, los fosfatos, los azúcares y las bases unidas en pares por medio de enlaces de hidrógeno. El segundo modelo utiliza los volúmenes atómicos correctos e ilustra el espacio ocupado por los diversos grupos.

En los últimos años se han obtenido, muchas evidencias para hacer de la hipótesis de Watson-Crick una de las más firmes generalizaciones de la teoría biológica. Estas evidencias incluyen (1) más estudios y en forma más extensa de la difracción de los rayos X; (2) la inspección directa por medio del microscopio electrónico (Fig. 7-7) la cual muestra que la masa por unidad de longitud está de acuerdo con el modelo; (3) los datos fisicoquímicos del llamado "punto de fusión" del ADN, que es la temperatura en la cual se rompen ambos enlaces de hidrógeno, causando la ruptura de la rígida molécula del ADN; (4) los estudios de la digestión enzimática, en los cuales la cinética observada sigue una norma predicha, como consecuencia de la estructura de doble espiral, y, finalmente, (5) el trabajo espectacular de Konrberg y su grupo al efectuar la síntesis del ADN en un tubo de ensayo (véase el Cap. 12).

Significado biológico

Se ha sugerido desde hace tiempo que el material hereditario o genético de la célula debe tener dos funciones por separado. Debe ser capaz de autoduplicarse y de iniciar acciones que finalmente encuentren expresión en una estructura o función celular determinada. Como resultado del trabajo de genética bioquímica comenzado por **Ephrussi** y por **Beadle** y **Tatum** (véase *Genética* de esta serie) parece ser ahora que la expresión de la acción del gen es la formación de una proteína, ya sea una proteína enzimática o estructural. El ADN debe ser, por lo tanto, capaz tanto de duplicarse a si mismo como de proveer la información necesaria para la síntesis de la proteína. Es claro que la estructura del ADN proporciona un medio conveniente por medio del cual una molécula en particular con una secuencia particular de pares de bases, se podría duplicar. Así cada espira de la molécula podría determinar el crecimiento de una "espira complementaria", resultando la formación de dos moléculas idénticas (Fig. 7-8A). Un modelo geométrico exacto, por medio del cual puede tener lugar la duplicación de la molécula del ADN, en una forma continua, sin necesitar la separación previa de la espira, fue sugerido por Levinthal y Crane (Fig. 7-8B).

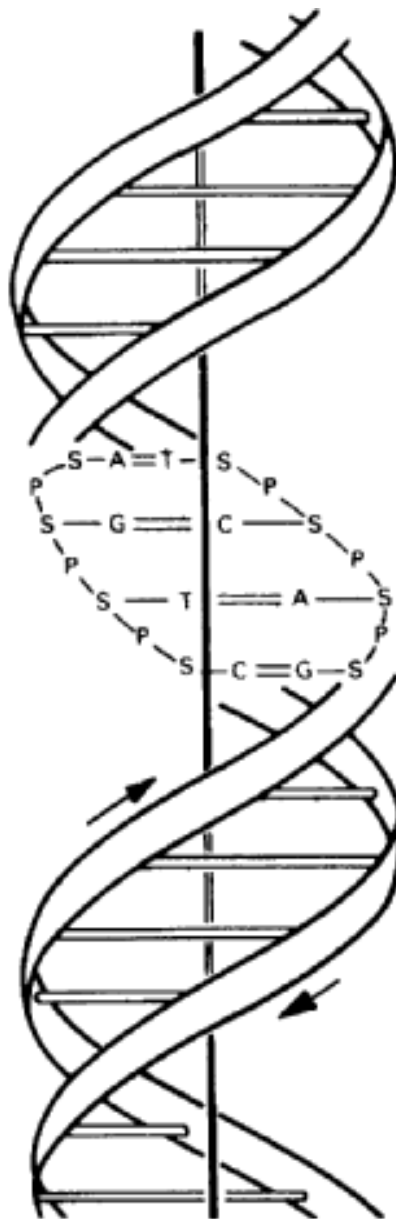


Fig. 7-6A. Modelo diagramático de una pequeña porción de la molécula del ADN

Ellos sugirieron que la duplicación podía empezar en uno de los extremos, abriendo así la espira y proporcionando la energía necesaria para la rotación de las dos espiras hijas en crecimiento, así como también para el acortamiento de la espira progenitora. Sacaron en conclusión que había suficiente energía para vencer la resistencia viscosa que se opone a esas rotaciones y bastante fuerza mecánica en la espiral para soportar la torsión necesaria sin originar una seria dilatación de los enlaces. La duplicación de la hélice del ADN que se muestra en la Fig. 7-8B es, en la actualidad, un símbolo familiar de la biología molecular.

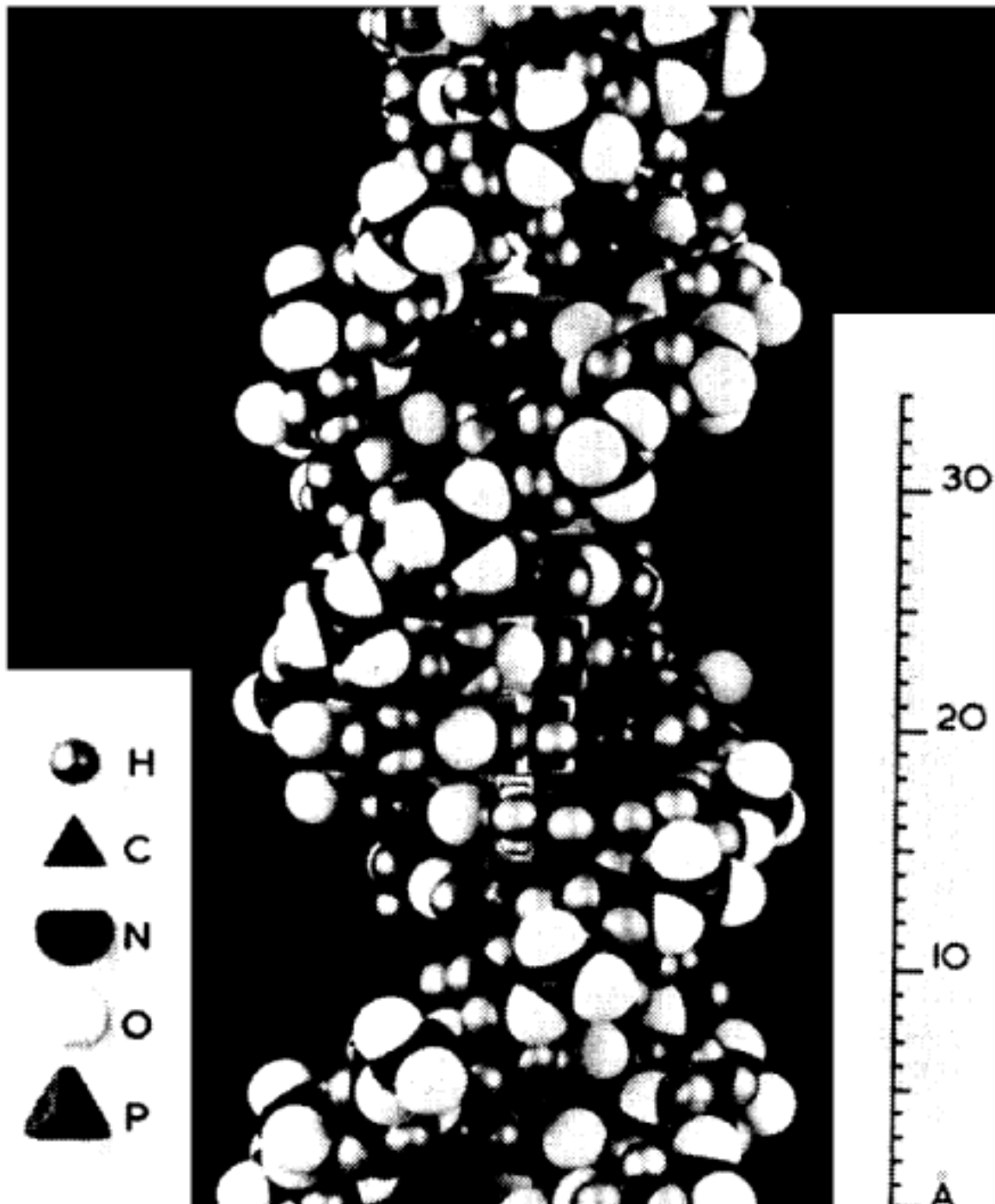


Fig. 7-6B. Modelo atómico a escala de la molécula del ADN. (Cortesía de M. H. F. Wilkins, King's College, Inglaterra)

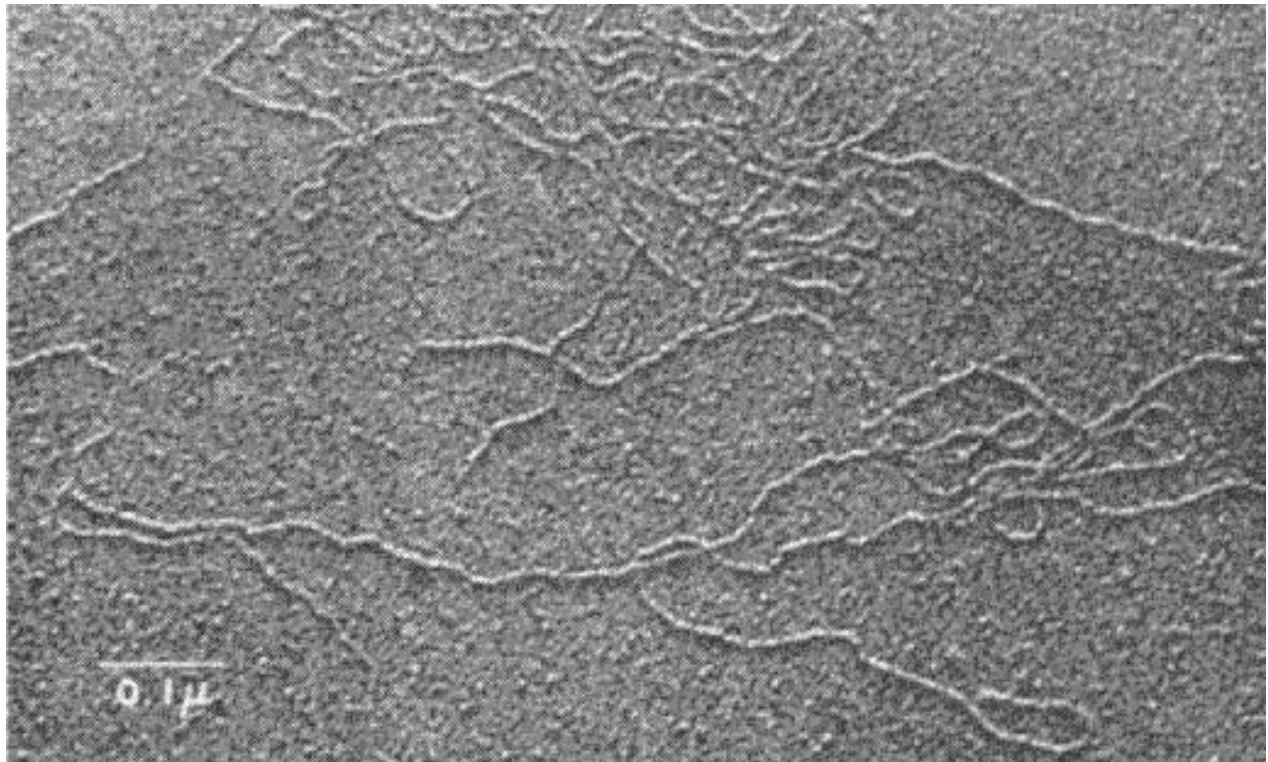


Fig. 7-7. Moléculas de ADN del esperma de salmón ($\times 108150$). (Cortesía de C. E. Hall y M. Litt, Massachusetts Institute of Technology)

Por lo que respecta al papel del ADN de almacenar y transmitir información para ser utilizada en la síntesis de la proteína, podría parecer que la secuencia específica de las bases a lo largo de esta estructura lineal proporciona el código necesario para determinar la estructura de la proteína. En un capítulo posterior diremos algo más sobre esta función crucial de la célula. Es suficiente apuntar aquí la sugestión de Crick de que, si uno se imagina los pares de bases correspondiendo a los puntos y rayas de la clave de Morse, existe cantidad suficiente de ADN en la célula humana para poner en clave Morse, 1000 voluminosos libros de texto. Hemos sugerido en capítulos anteriores que un signo característico de la maquinaria viviente es su capacidad para la "microminiaturización". Aquí tenemos, en verdad, un asombroso ejemplo de esta propiedad celular: la capacidad de 20×10^{-12} g de ADN en el huevo humano fecundado para determinar todas las características hereditarias del individuo humano maduro, pesando 5×10^{15} cuando más. O, como se ha enunciado, todo el ADN que determina los caracteres hereditarios de toda la población de la tierra, se podría encerrar en la cabeza de un alfiler.

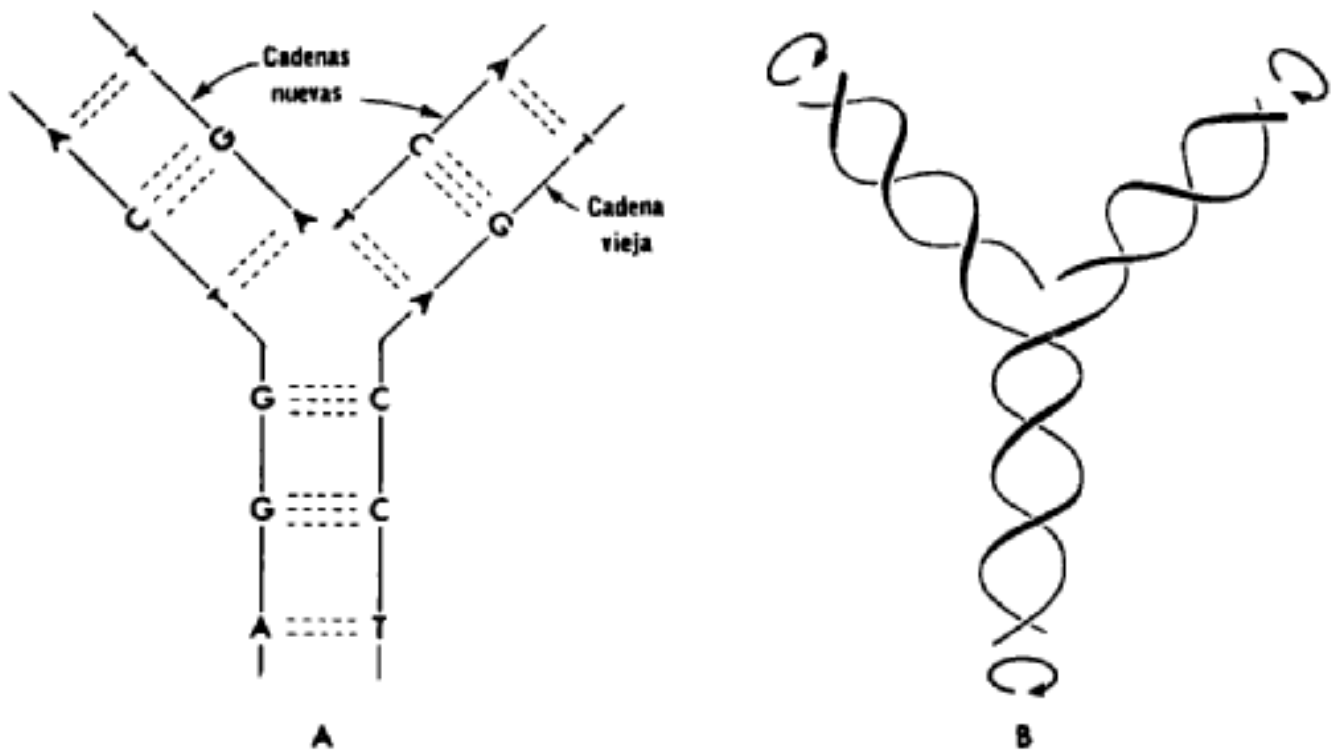


Fig. 7-8. La réplica de la molécula del ADN

ESTRUCTURA DEL ARN

Nuestro entendimiento de la estructura y función biológica del ARN es de origen más reciente y menos completo que el del ADN. Existe actualmente evidencia de por lo menos tres tipos de ARN celulares no contando al ARN de los virus vegetales y de algunos virus animales. En los Caps. 12 y 13 discutiremos la función biológica del ARN con más detalle. Y, por lo tanto, concretaremos nuestra presente discusión solamente a consideraciones estructurales.

Aproximadamente 60 al 80% del ARN de la célula se encuentra en las partículas de ribosoma. Estas grandes partículas de ribonucleoproteína pueden extraerse para proporcionar preparaciones de ARN de muy elevado peso molecular (5×10^5 a 2×10^6).

Hace muy poco se ha identificado una nueva forma de ARN a la que se ha dado el nombre de *ARN mensajero*. Se cree actualmente que es fabricado en el núcleo y que después de pasar al citoplasma, se une a los ribosomas. Parece que esta unión depende de la concentración de Mg^{2+} ; una concentración de $10^{-2}M$ favorece la unión y una de $10^{-4} M$ provoca la disociación. Las estimaciones hechas hasta el presente del peso molecular del ARN mensajero indican que es un material polidisperso, cuyo peso molecular varia de 5×10^4 a 5×10^5 y posiblemente más.

Una tercera forma de ARN, denominada *ARN transporte*, es de bajo peso molecular (30 000) y por razones que se harán claras más adelante (Cap. 13), se espera encontrar en la célula 20 especies moleculares diferentes, una para cada aminoácido encontrado en las proteínas.

La organización estructural del ARN hasta recientemente, había sido un completo misterio. En junio de 1962, Wilkins y sus colaboradores informaron que habían tenido éxito en la cristalización de las sales de sodio del ARN transporte. Los estudios cristalográficos de estos cristales, efectuados por medio de los rayos X, revelaron los mismos principios estructurales encontrados en el ADN; es decir, una doble espiral formada por cadenas antiparalelas, mantenidas juntas por medio de enlaces de hidrógeno entre las bases complementarias. La diferencia en el ARN parece ser que la doble espiral está formada *por una sola cadena* doblada en el centro y retorcida alrededor de si misma (véase la Fig. 7-9).

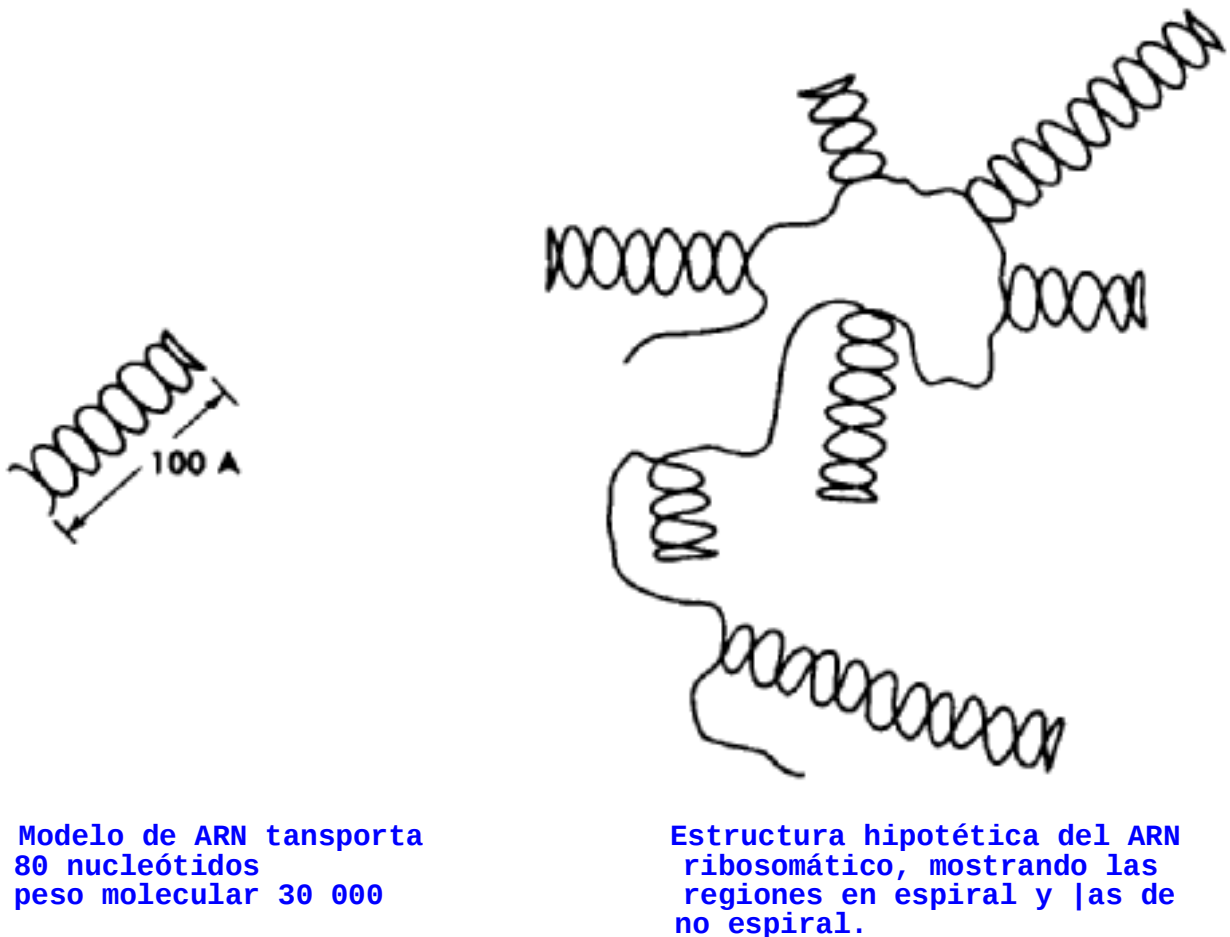


Fig. 7-9. Modelos de doble espiral de cadenas aisladas de ARN transporte (cortesía de M. H. F. Wilkins) y estructura hipotética del ARN ribosómico.

Los investigadores sugirieron que esta disposición deja tres bases impares en un extremo capaces de unirse mediante enlaces de hidrógeno con tres bases posiblemente en el ARN mensajero. Las implicaciones de esta sugestión se harán más claras en el Cap. 13.

Wilkins y sus colaboradores sugieren que las otras formas de ARN también contienen extensas regiones de doble espiral como también lo han hecho numerosos estudios fisicoquímicos diversos. Pero, puesto que el ARN ribosomático, a diferencia del ARN transporte y del ARN mensajero no tiene igualdad en $A = T$ y $G = C$, solamente algunas porciones de este ARN se puede esperar que sean de doble espiral (véase la Fig. 7-9).

Se cree que el papel del ARN es convertir el mensaje del ADN en una forma que pueda ser utilizada para la síntesis de las proteínas y en el Cap. 13 tendremos que decir algo más acerca de esto. Sin embargo, es apropiado considerar ahora a las proteínas, las cuales son las macromoléculas fisiológicamente activas y estructuralmente significativas de las células.

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

- ALLEN, J. M., ed., 1962. *The molecular control of cellular activity*. New York: McGraw-Hill.
- CHARGAFF, E., and DAVIDSON, J. N., eds., 1955. *The nucleic acids*. New York: Academic Press.
- CRICK, F. H. C., "Nucleic acids," *Scientific American*, September 1957.
- , «The structure of the hereditary material," *Scientific American*, October 1954.
- DAVIDSON, J. N., 1960. *The biochemistry of nucleic acids*, 4th ed. New York: Wiley.
- KORNBERG, A., 1962. *Enzymatic synthesis of DNA*. New York: Wiley.

CAPITULO OCHO

LAS PROTEINAS, AGENTES DE ESPECIFICIDAD BIOLOGICA

Las proteínas, como la derivación de la palabra lo implica, son de primordial importancia para la vida de la célula. Como muestra la Tabla 8-1, las proteínas constituyen el componente principal de la sustancia seca de una célula en desarrollo

TABLA 8-1. RESULTADOS ANALITICOS TIPICOS OBTENIDOS DEL FRACCIONAMIENTO DE CELULAS EN RAPIDO DESARROLLO

(Estos resultados son característicos para células que carecen de paredes con polisacáridos o grandes cantidades de materiales estructurales o de almacenamiento)

Material	Criterios empleados para la fracción	Porcentaje en peso de la materia seca
Pequeñas moléculas "fracción soluble en ácido"	solubilidad en ácido tricloro- acético al 5% en frio	2 - 3
Lipidos "fracción soluble en solvente orgánico"	solubilidad en alcohol-éter a 50°C	10-15
Acidos nucleicos "fracción soluble en ácido caliente"	solubilidad en ácido tricloro- acético, al 5% a 90°C durante 30'	10 - 20
Protetnas "fracción insoluble en ácido caliente"	insolubilidad en ácido tricloro- acético, al 5% a 90°C durante 90'	55 - 85

activo. Lo que es más notable acerca de las proteínas es que ellas no son solamente el material principal con que se ha fabricado la estructura celular, sino que también son las reguladoras de todas las actividades que se llevan a cabo en la máquina viviente. Para realizar su función reguladora, las proteínas están dotadas de *especificidad*, o sea, la capacidad para distinguir entre moléculas diferentes. Esta propiedad, más que cualquier otra, es característica del fenómeno de la vida misma. Se cree que esta especificidad de las proteínas no solamente permite la regulación de la multitud de los procesos celulares, sino que es también la base molecular de las diferencias que existen entre individuos y entre especies.

Una ley constante de la naturaleza es que la estructura y la función se encuentran relacionadas. Así, nosotros creemos que la clave para comprender cómo se comportan las proteínas es conocer en detalle cómo se encuentran agrupadas. En los últimos quince años, una asombrosa serie de adelantos se ha añadido a nuestro conocimiento de la estructura de las proteínas. Intentaremos dar aquí una información de estos adelantos, con el fin de construir en la mente del estudiante un cuadro vivo de la molécula de la proteína.

PURIFICACION DE LAS PROTEINAS

Con el fin de estudiar determinada proteína debemos obtenerla en estado puro, separándola de las otras proteínas del "extracto" inicial obtenido del tejido vivo. Los procedimientos empleados constituyen un arte altamente refinado y en rápido desarrollo, que no trataremos de describir aquí. El primer éxito notable en la purificación de las proteínas fue obtenido por **James Sumner** (1926), quien cristalizó la proteína *ureasa* del tejido del haba americana. Esta importante realización marcó el fin de una era durante la cual los biólogos habían considerado a las proteínas con un pavor que impedía la utilización de enfoques químicos directos para el estudio de estos complicados compuestos. En verdad, muchos biólogos dieron poca importancia al descubrimiento de Sumner por varios años. Actualmente, se han cristalizado unas 75 proteínas diferentes y un número mucho mayor se ha preparado en un alto estado de pureza.

Dos propiedades especiales de las proteínas tienen una influencia importante en el éxito de la purificación de ellas. (1) Las proteínas son compuestos lábiles capaces de perder sus propiedades biológicas específicas bajo diversos tratamientos químicos y físicos relativamente débiles (desnaturalización). Así, después de cada purificación es necesario demostrar que no ha tenido lugar una desnaturalización significativa. (9.) A causa del tamaño de la molécula de las proteínas y la floja estructura del cristal proteínico, se puede introducir una cantidad considerable de impurezas en un preparado cristalino.

En años recientes, se ha empleado un número cada vez mayor de pruebas rigurosas para valorizar la pureza u "homogeneidad" de una preparación de proteína. Así, una purificación exitosa de una proteína es aquella, que comprende un mínimo de desnaturalización y satisface diversas pruebas de homogeneidad.

TAMAÑO Y FORMA DE LAS MOLECULAS DE LAS PROTEINAS

El tamaño muy grande de las moléculas de las proteínas y su relativa labilidad, presentan al químico que estudia su estructura un número de problemas que no puede resolver con los métodos que se aplican a moléculas pequeñas. Por lo tanto, se han desarrollado y perfeccionado diversos métodos durante los últimos veinte años, que han hecho posible determinar, con bastante precisión, el peso molecular y en menor escala la forma de las macromoléculas.

Por ejemplo, en la ultracentrífuga, las macromoléculas pueden girar a velocidades superiores a 60 000 rpm, aumentando así la fuerza gravitacional sobre las moléculas a más de 100000 veces la de la gravedad.

TABLA 8-2 PESOS MOLECULARES DE ALGUNAS PROTEINAS, DETERMINADOS POR VARIOS METODOS DIFERENTES

Proteína	Presión osmótica	Dispersión de la luz	Proporción de sedimentación y de difusión	Equilibrio de sedimentación	Métodos químicos
Insulina	12000	12000			*6000
Ribonucleasa			12700	13000	12000
Pepsina	36000		35500	39000	
Ovalbúmina	40000			40500	
	46000	38000	44000	43500	
Hemoglobina	67000		63000		66800
Albúmina de suero bovino	69000	77000	65400	68000	
Hemocianina (Polinurus)		461000	450000	450000	
Virus del achaparramiento del tomate	9000000		10600000	7600000	
Virus del mosaico del tabaco	40000000		40700000		

*La discrepancia en el caso de la insulina se debe a la tendencia de ésta a dimerizarse.

Esta fuerza, que origina la «sedimentación» de las moléculas, es contrarrestada por la difusión al azar de las moléculas. Puesto que el equilibrio entre estas dos fuerzas está en relación con el peso molecular, la última se puede medir para las macromoléculas con bastante precisión.

Otros métodos utilizan las propiedades de la dispersión de la luz que poseen las macromoléculas, la presión osmótica de las soluciones de proteínas, la proporción de sedimentación en un elevado campo gravitacional combinada con el coeficiente de difusión, la difracción de los rayos X por los cristales de proteína y la visualización directa y conteo en el microscopio electrónico y, en algunos casos, el análisis químico directo también se ha desarrollado. La Tabla 8-2 es una lista de los pesos moleculares de algunas proteínas y nucleoproteínas que han sido determinados por varios métodos; se puede ver que, en las principales, los valores obtenidos concuerdan muy bien.

Por otra parte, la determinación de la forma molecular está aún llena de dificultades. Los métodos «hidrodinámicos» que se basan en la relación entre la asimetría molecular y la fuerza de fricción necesaria para mover las moléculas a través del solvente, son rápidos, precisos y se llevan a cabo fácilmente. Desgraciadamente, a causa de algunas suposiciones, estos métodos proporcionan resultados equivocados. El microscopio electrónico y los métodos de difracción de los rayos X nos han dado, en los últimos años «imágenes» espectaculares de la forma de las moléculas de proteína, pero el primero, hasta ahora, permite la resolución clara de la forma de las más grandes moléculas solamente y los últimos, sólo se han aplicado en muy pocos casos hasta ahora. La Fig. 8-1 muestra algunas moléculas de proteínas tales como aparecen en el microscopio electrónico.

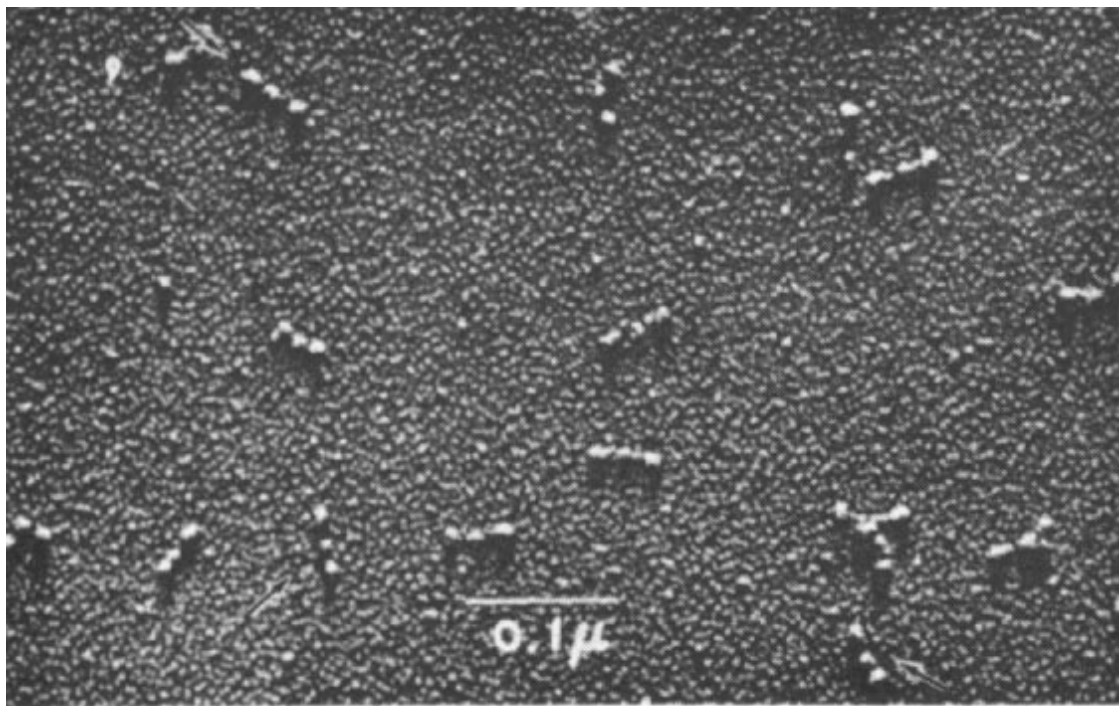
La aplicación de los métodos anteriormente mencionados y de otros métodos físicos ha resultado en la siguiente representación de una estructura aproximada (tamaño y forma) de la molécula de proteína.

(1) El peso molecular de las proteínas varía en una gran escala (insulina, 6000, hemocianina del caracol, 6700000). Sin embargo, las grandes proteínas están generalmente compuestas de subunidades más pequeñas.

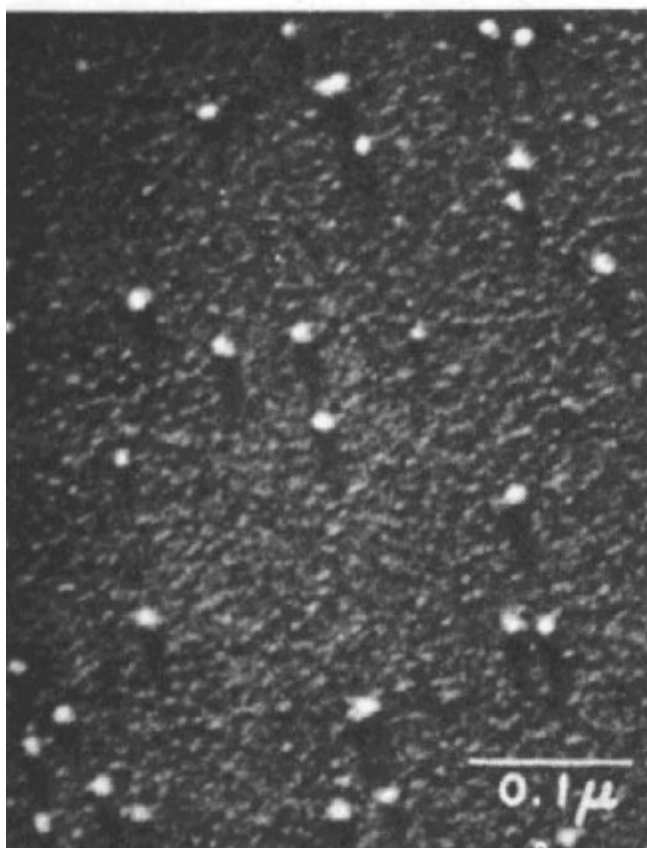
(2) Las formas varían considerablemente desde casi esféricas hasta las altamente asimétricas.

(3) A diferencia de muchos polímeros sintéticos, las proteínas son partículas rígidas, de forma definida.

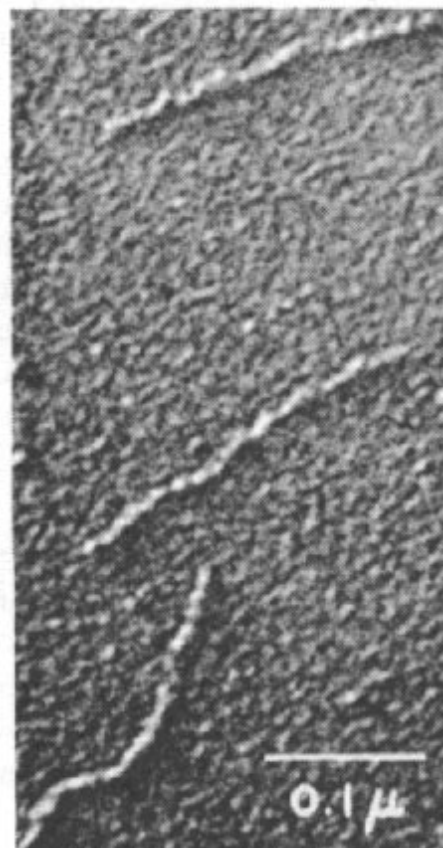
Al final de este capítulo discutiremos los resultados recientes de la aplicación de la difracción de los rayos X a las estructuras detalladas o «finas» de dos moléculas de proteínas, la mioglobina y la hemoglobina. Estos estudios muestran que las proteínas, a pesar de su enorme tamaño y complejidad, son moléculas altamente uniformes con una arquitectura precisa y definida.



A



B



C

Fig. 8-1. Micrografías electrónicas en aspecto oscuro, de varias moléculas de proteínas A: moléculas de fibrinógeno (X 150000). (Cortesía de C. E. Hall y H. S. Slayter, Massachusetts Institute of Technology). B: moléculas de fosfatasa alcalina (X 163000). (Cortesía de Hall). C: moléculas de colágeno (X 166000). (Cortesía de Hall y P. Doty)

ESTRUCTURA PRIMARIA -- LA SECUENCIA DE LOS AMINOACIDOS

Cuando se calienta una proteína con un ácido fuerte a 100°C por varias horas, se descompone o hidroliza en los bloques componentes de su estructura, llamados aminoácidos. Existen alrededor de 20 aminoácidos diferentes en las proteínas de todos los organismos, aunque ciertas proteínas pueden tener menos y algunos organismos pueden contener aminoácidos especiales que representan ligeras modificaciones de los 20 aminoácidos principales. La Fig. 8-2 muestra la estructura básica de todos de los 20 aminoácidos. Muestra que a pH neutro, el aminoácido es un "zwitterion" que contiene simultáneamente

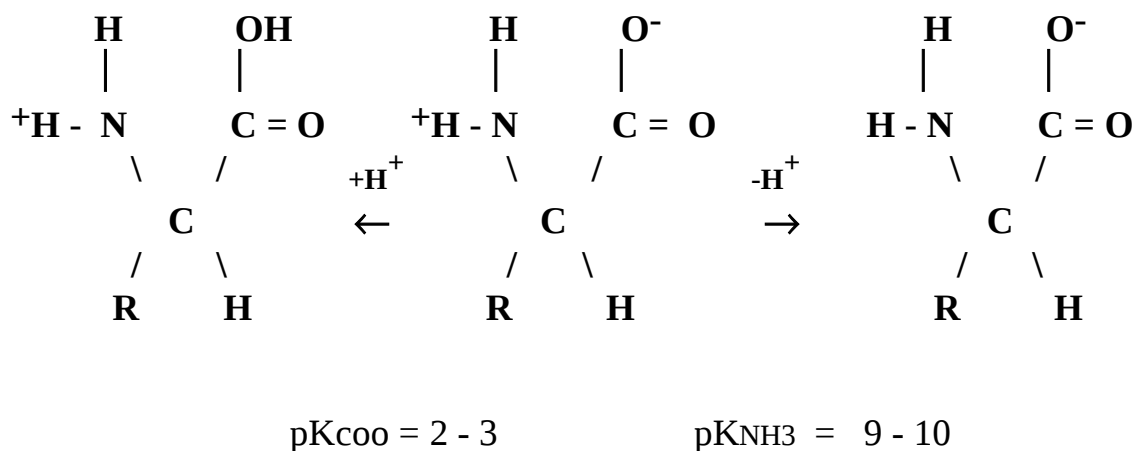
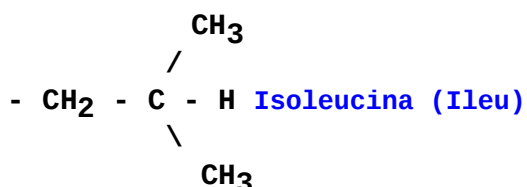


Fig. 8-2. Formas Zwitterion de aminoácidos

un grupo negativo y otro positivo. También muestra que el átomo de carbono α es asimétrico, puesto que tiene unidos a él, cuatro grupos diferentes. Todos los aminoácidos derivados de las proteínas son l-aminoácidos (excepto la glicina, que no es ópticamente activa), un hecho que sugiere firmemente el origen común de toda la materia viviente sobre la tierra. El símbolo R de la Fig. 8-2 representa la porción variable de la molécula que diferencia un aminoácido de otro. La Fig. 8-3 es una lista de los diferentes grupos R de los 20 aminoácidos más comunes. Obsérvese que el último, la prolina, es el único miembro atípico de la serie, en el sentido de que el grupo α -amino no se encuentra libre sino que forma parte de una estructura en anillo. Los aminoácidos constituyen el alfabeto de la estructura proteínica y son, finalmente, responsables de la especificidad y variabilidad de la materia viviente. Se aconseja al estudiante de biología, familiarizarse con estos importantes compuestos, porque las próximas décadas serán testigos de la explicación del papel preciso desempeñado por los grupos R de los aminoácidos, en las interreacciones moleculares específicas de la célula.

NO POLARES (ALIFATICOS)

- H Glicina (Gli)
 - CH₃ Alanina (Ala)



ALCOHOLES (ALIF. Y AROM)

-CH₂ - OH Serina (Ser)



-CH₂-C₆H₄-OH Tirosina (Tir)

ACIDOS CARBOXILICOS

-CH₂ - COO - Acido aspártico (Asp)
 -CH₂-CH₂-COO- Acido glutámico (Glu)

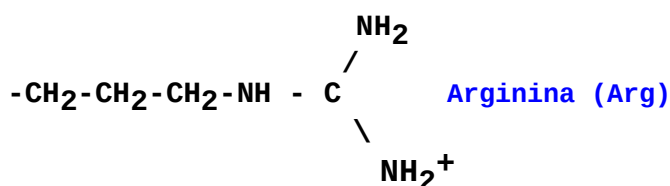
AMIDAS

-CH₂ - CONH₂ Asparagina (Asp-NH₂)

-CH₂ - CH₂ - CONH₂ Glutamina (Glu-NH₂)

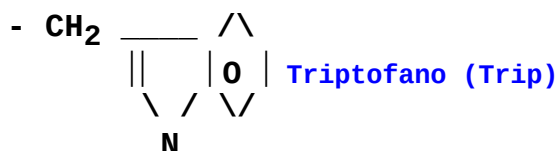
BASES AMINA

-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₃⁺ Lisina (Lis)



OTROS AROMATICOS

-CH₂-C₆H₅ Fenilalanina (Fen)



CONTENIENDO AZUFRE

-CH₂-SH Cisteina (CiSH)

-CH₂-CH₂-S-CH₃ Metionina (Met)

CONTENIENDO EL GRUPO IMINO



Fig. 8-3. Los "Grupos R" de los 20 más comunes aminoácidos que se encuentran.

La separación de los 20 aminoácidos entre si fue una tarea formidable, a la cual, el famoso químico *Emil Fisher* (1852-1919) dedicó muchos años de su vida. En 1941,

Martin y Synge propusieron un nuevo enfoque al problema de la purificación y estimación de los compuestos que se asemejan entre sí. Este enfoque implicaba la disolución de la mezcla de aminoácidos en un par de solventes y luego la "percolación" de esta mezcla a través de tiras de papel filtro o a través de columnas. Usando un segundo par de solventes y haciendo girar el papel 90° , es posible separar los aminoácidos bidimensionalmente sobre una gran hoja de papel filtro (Fig. 8-4). A causa de que estos métodos tenían algunas semejanzas con la técnica empleada muchos años antes por Tswett para la separación de los pigmentos de la hoja, Martín y Synge le dieron al procedimiento el nombre de *cromatografía*.

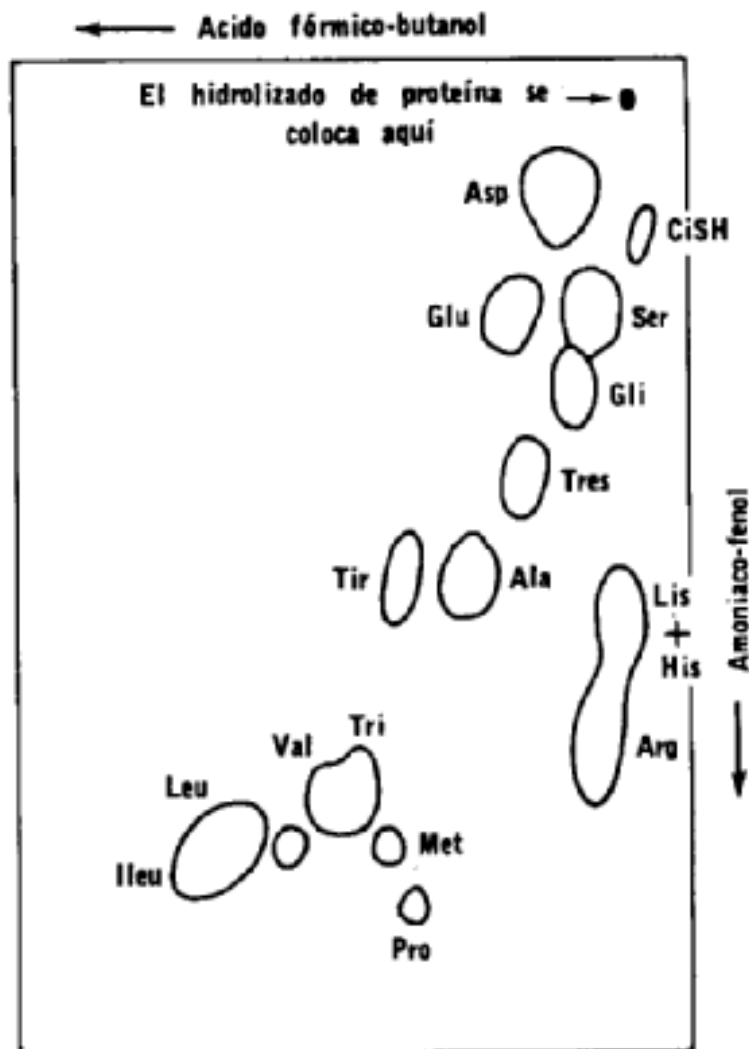


Fig. 8-4. Cromatografía bidimensional en papel de aminoácidos

En los últimos 20 años, los métodos cromatográficos han sido extendidos y perfeccionados a tal grado, que en la actualidad son los más ampliamente empleados en técnicas para análisis y purificación. Lo "último" en análisis de aminoácidos se ha

obtenido en el laboratorio de Moore y Stein, quienes han perfeccionado una columna cromatográfica de aminoácidos y construido una máquina automática para su determinación. Este dispositivo es capaz de tomar el hidrolizado de 1 mg de proteína y estimar la concentración de cada uno de sus aminoácidos componentes con una exactitud de unos cuantos centésimos. Moore y Stein utilizaron una columna de resinas intercambiadoras de iones fabricadas de poliestireno sulfonado. El preparado del aminoácido se coloca en la columna, en un buffer, a baja concentración de pH y baja resistencia iónica, que son las condiciones para el enlace máximo de los aminoácidos cargados positivamente con los grupos $-\text{SO}_4^-$ sobre la resina. Se deja correr el buffer a través de la columna elevándose tanto el pH como la resistencia iónica. Este proceso, llamado elución provoca que los diferentes aminoácidos se percolen en la columna a diferentes velocidades, separándose así en bandas diferentes. El "eluato" que emana en el fondo de la columna es recogido, ya sea en fracciones separadas por medio de un *colector de fracciones* automático o procesado con una máquina también automática. En el primer caso, las fracciones separadas se hacen reaccionar con un reactivo llamado ninhidrina. el cual da un color púrpura en presencia de aminoácidos y la intensidad del color se estima en un colorímetro; comparando este resultado con una curva estándar, permite calcular la concentración del aminoácido. La máquina automática ejecuta la reacción de la ninhidrina automática y continuamente, en tanto que un registrador marca, en una gráfica, la intensidad del color, a medida que pasa por el colorímetro. Aunque a primera vista tal procedimiento pudiera aparecer como un dispositivo muy sofisticado, en los últimos años ha sido posible, de hecho, verificar varios experimentos muy importantes que requieren tanto la rapidez como la precisión de estos nuevos métodos automáticos.

La Fig. 8-5 representa un cromatograma de una mezcla de aminoácidos obtenido por el método de Moore y Stein. La concentración de cada aminoácido es proporcional al área debajo de la curva.

Una vez que la proteína se hidroliza en sus bloques componentes, es lógico examinar cómo éstos se ajustan en la molécula de la misma. Fisher fue capaz de demostrar que, en la hidrólisis de la proteína, se pone en libertad igual número de grupos amino y carboxilos. Para explicar este resultado, sugirió que los aminoácidos estaban ligados unos con otros por medio de un enlace peptídico (Fig. 8-6). El equilibrio de esta reacción está netamente del lado de la hidrólisis, y, como veremos más adelante, la célula sintetiza el enlace peptídico durante la síntesis de la proteína por medio de un mecanismo completamente diferente. La teoría del enlace peptídico de Fisher, en la estructura de la proteína, ha sido desde entonces corroborada por muchas pruebas evidentes. Las enzimas proteolíticas, por ejemplo, que se sabe rompen el enlace peptídico de los péptidos sintéticos, son también capaces de hidrolizar proteínas.

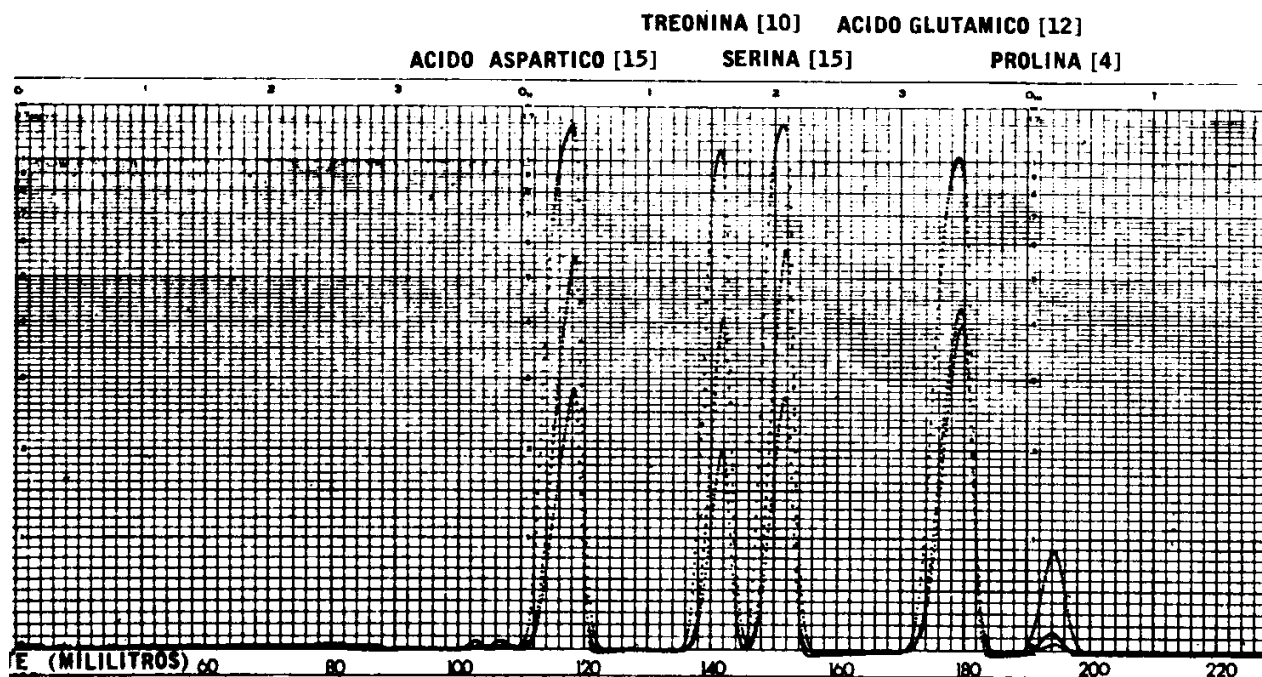


Fig.8-5. Columna cromatográfica de aminoácidos, empleando el analizador automático de aminoácidos de Moore y Stein. Nótese que el análisis se efectuó en 3 niveles de sensibilidad. El análisis es de una muestra hidrolizada de la proteína ribonucleasa. (Reimpreso con permiso Copyright 1961 por *Scientific American, Inc.* Todos los derechos reservados)

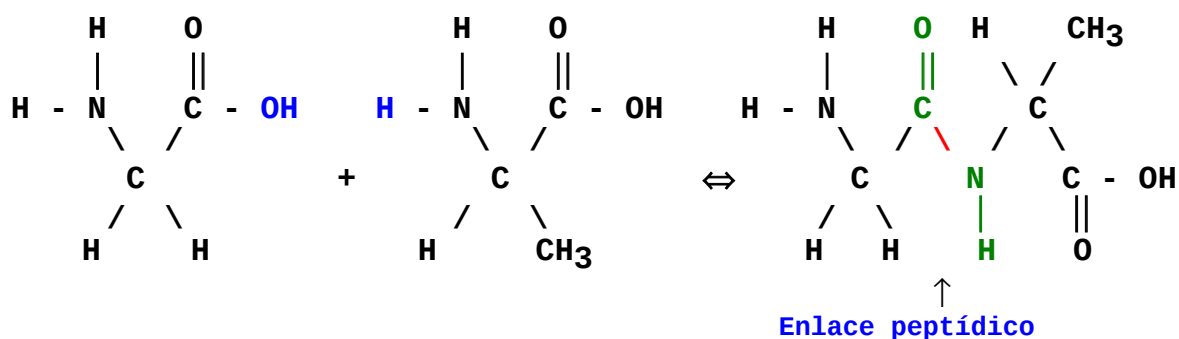
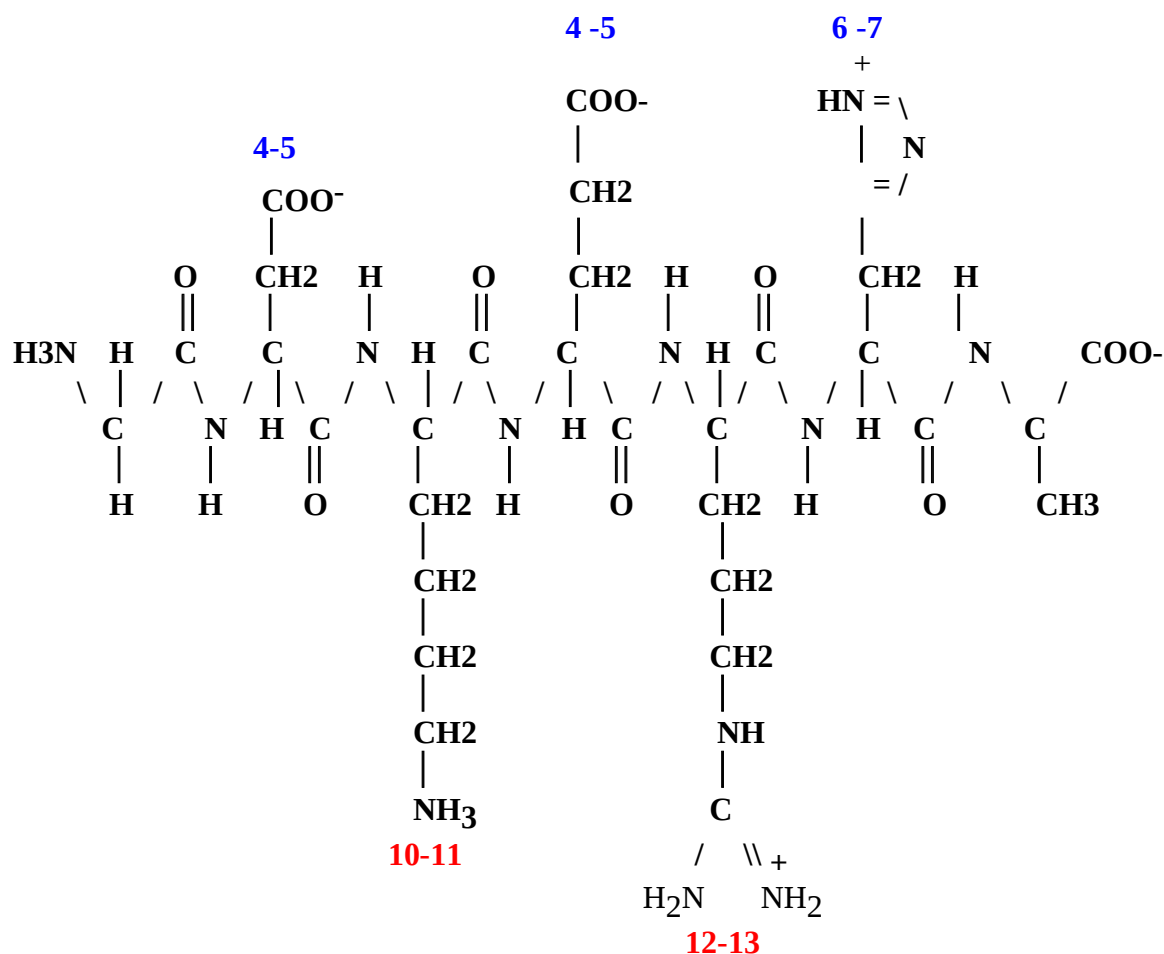


Fig. 8-6. El enlace peptídico.

La Fig. 8-7 es un diagrama de una cadena hipotética de aminoácidos, denominados polipéptidos. Obsérvese que, excepto los grupos del carboxilo terminal (C terminal) y del amino terminal (N terminal), todos los carboxilos α restantes y los grupos amino α están involucrados en el enlace amido. Este enlace no es capaz de poner en libertad o aceptar protones y por consiguiente, no contribuye a las propiedades

ácido-base del polipéptido. Las propiedades electroquímicas en un pH fisiológico del polipéptido (y, por lo tanto, de la proteína) están determinadas por los grupos R



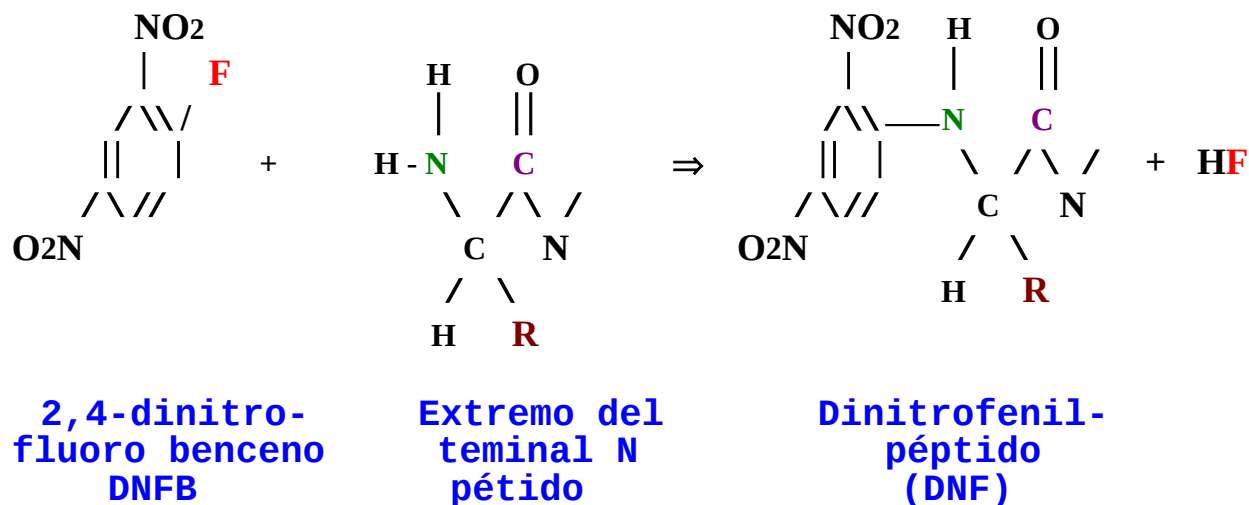
Glicil -aspartil-lisil-glutamil-arginil-histidil-alanina

Fig.8-7. Un polipéptido hipotético conteniendo todos los grupos que normalmente contribuyen a las cargas de las proteínas. El número representa el rango del pK de cada grupo disociado.

de los aminoácidos ácidos, ácido aspártico y ácido glutámico, y los aminoácidos básicos, lisina y arginina, y por la histidina. La última es importante porque es el único aminoácido, con excepción del N terminal del grupo amino, con un pK en la región del pH fisiológico y, debido a esto, es el único aminoácido que podría contribuir a un cambio en la carga de la proteína originado por pequeños cambios del pH bajo condiciones fisiológicas. El papel de este aminoácido en un mecanismo para la regulación celular, aún no se ha descubierto.

El polipéptido hipotético de la Fig. 8-7 muestra todos los grupos R que contribuyen a la carga de una proteína en un pH fisiológico. Muestra por extrapolación, que una proteína es un ion polivalente que contiene varias cargas positivas y negativas. De las propiedades de disociación de los grupos, uno puede predecir qué podría suceder si se añaden un ácido o una base a una proteína. Así, cuando se añade un ácido -COO⁻, cambiará a -COOH y, por lo tanto, dejará a la proteína con una carga positiva neta: cuando se añade una base, -NH₃⁺, cambiará a -NH₂, dejando a la proteína con una carga negativa neta. En cierto pH intermedio, llamado *punto isoeléctrico*, el número de cargas positivas iguala al número de cargas negativas. Puesto que la mayoría de las proteínas tienen puntos isoeléctricos del lado del ácido, llevarán una carga negativa neta en un pH fisiológico. Sin embargo, las protaminas y las histonas, que son proteínas que se encuentran en los cromosomas, contienen grandes cantidades de lisina y arginina, llevando, por lo tanto, carga positiva neta bajo condiciones normales. Sin lugar a duda, esta propiedad desempeña un importante papel en la estructura molecular de los cromosomas, los cuales, en parte, están compuestos de proteínas cargadas positivamente interactuando con el ADN cargado negativamente.

Hemos señalado que es posible determinar la composición del aminoácido de un polipéptido. Sin embargo, ¿es posible determinar la secuencia específica de los aminoácidos en el polipéptido? Sanger fue el primero en demostrar que esto, en verdad puede hacerse. Como es generalmente el caso al tratarse de una *primera* contribución en determinado campo, su descubrimiento es notable, no solamente por la muy importante contribución técnica hecha al contestar esta pregunta, ni por los grandes alcances de las conclusiones teóricas derivadas de los resultados, sino por la intuición y fe implicadas en hacerse la pregunta de este asunto en particular. Las primeras tradiciones de la química de las proteínas se derivaron de la química de los coloides, que consideraban a sus materiales como entidades químicamente indefinidas para ser caracterizadas por parámetros estadísticos más bien que por parámetros químicos precisos. Sanger desafió a esta tradición al hacer una pregunta que hasta recientemente como lo es 1945, fue considerada descabellada por la mayoría de los químicos dedicados a las proteínas. El preguntó: "¿Tienen las proteínas una composición química específica y definida hasta la *secuencia* de los 20 bloques constructivos? Hacer esta pregunta y estar dispuesto a invertir 10 años de la vida de uno para contestarla, implica una creencia en la exactitud *absoluta* por medio de la cual, las macromoléculas biológicas son replicadas y sintetizadas. El grado hasta el cual tomamos esto como correcto en la actualidad, es un tributo a la inmensa contribución de Sanger. Cuando él comenzó su estudio que hizo época, sobre la proteína *insulina*, el método de la cromatografía de papel para la separación de los aminoácidos, acababa de ser desarrollado por Marfin y Synge. A éste, Sanger añadió una técnica propia, el "*rotulado*" del grupo terminal amino (grupo terminal N) de un péptido, combinándolo con el compuesto amarillo dinitrofluorobenceno 2-4 (DNFB), para dar el dinitrofenil (DNF) péptido.



Este compuesto amarillo es estable durante la hidrólisis del péptido y es posible, empleando la separación cromatográfica después de la hidrólisis, identificar el aminoácido particular al cual está unido el DNF. Determinando el N del aminoácido terminal, fue posible para Sanger orientar al péptido, es decir, distinguir un extremo del otro. Sanger también desarrolló varios métodos para hidrolizar, parcialmente, la molécula de la insulina en péptidos de diferentes longitudes. Igualmente desarrolló procedimientos cromatográficos para separar estos péptidos unos de otros, lo cual le permitió determinar su composición aminoácida y la identidad del N del aminoácido terminal. Algunos de los péptidos más largos, tuvieron que ser hidrolizados por segunda vez, cromatografiados y otra vez analizados para conocer los grupos terminales. A medida que se acumulaban datos, más y más de la secuencia llegaba a ser definida de manera única. Finalmente, *toda* la secuencia llegó a estar definida de manera única, después de lo cual, todos los datos nuevos, simplemente verificaron la estructura existente sin proporcionar ninguna evidencia en contra de ella. La Fig. 8-8 es un resumen de los resultados que Sanger empleó para determinar la secuencia del aminoácido de una de las cadenas de polipéptidos de la molécula de la insulina.

Empleando el enfoque anterior, Sanger fue capaz de demostrar que solamente una secuencia finita satisfacerla los datos que había obtenido. Se demostró la primera vez, que, a pesar de la complejidad de la molécula de la proteína, la célula es capaz de sintetizarla en una forma químicamente precisa y reproducible. Es interesante observar que, aunque la insulina es una de las proteínas más pequeñas que conocemos, no es la más sencilla en su estructura ya que está compuesta de dos polipéptidos. La Fig. 8-9 muestra la secuencia o lo que se denomina, la estructura primaria, de una proteína mucho más grande (18 000 de peso molecular), que está compuesta de una sola cadena. La determinación de la secuencia de este polipéptido más largo resultó ser un problema mucho más difícil, que requería la precisión del método de la columna cromatográfica automática de Moore y Stein.

Se ha determinado actualmente la estructura primaria de varias otras proteínas, y, aunque la más larga cadena polipéptida, posiblemente de peso molecular de 60 000,

La propiedad de ser plano del grupo amida, así como la corta distancia de la ligadura del péptido (C-N) las explicó **Pauling** mediante una resonancia del doble enlace C=O como se muestra en la Fig. 8-10, siendo la estructura verdadera, un híbrido de los dos estados. Además, encontraron que el grupo amido estaba ordenado con la configuración *trans*; es decir, los dos átomos de carbono asimétricos quedaban en las esquinas opuestas del grupo. Finalmente, Pauling y sus colaboradores señalaron

que los enlaces con los carbonos de las esquinas del grupo amido eran enlaces químicos simples y, por consiguiente, capaces de rotación. Arguyeron que sería la rotación alrededor de este enlace la que determinaría la configuración del polipéptido. Construyendo modelos a escala, pronto descubrieron que se podía construir un gran número de configuraciones diferentes, si uno aceptaba las restricciones anteriores. Fue precisamente aquí, al decidir cuál de tantas configuraciones era la que más probabilidades tenía de ocurrir, donde Pauling dio el salto crucial intuitivo. Habiendo tenido gran cantidad de experiencia acerca de la importancia de los enlaces de hidrógeno en la estructura cristalina de compuestos de modelo, Pauling predijo que la configuración preferida del polipéptido sería aquella que favoreciera el enlace máximo de hidrógeno entre los grupos $-C=O$ y $-NH$ del enlace amido. Muy sabiamente, como una primera aproximación, decidió ignorar los efectos posibles de los grupos R. Descubrió entonces que, sometiendo cada grupo amido a lo largo del polipéptido, a una pequeña rotación, se generaba una espiral que tenía la propiedad de formar enlaces de hidrógeno a través de las vueltas de la misma. La llamada **espiral α** (Fig. 8-11) es capaz de formar enlaces de hidrógeno entre todos sus grupos amido, un hecho que, sobre fundamentos *a priori*, le darían el mayor grado de estabilidad. Las características de la espiral α pueden describirse, conociendo el número de residuos de aminoácidos por vuelta (3.6 A), el paso de la espiral (5.4A), el diámetro, incluyendo las cadenas laterales (10.5 A), y el número de residuos de aminoácidos en una vuelta con enlaces de hidrógeno. Estas dimensiones y otras más, se buscaron en varias proteínas y polipéptidos sintéticos por el método de análisis con rayos X y pronto se acumuló gran cantidad de evidencia para sostener el brillante análisis de Pauling. Como veremos más adelante, hay en la actualidad más evidencia directa de la existencia de la espiral α en las proteínas.

ESTRUCTURA TERCIARIA

LA CONFORMACION DEL POLIPEPTIDO

Como ya hemos dicho, las proteínas son moléculas compactas, rígidas (Fig. 8-1). Aunque la formación de una espiral α acortaría la cadena polipeptídica extendida, esto daría lugar, sin duda alguna, a una molécula compacta, casi esférica. Así, las dimensiones de una espiral α de la proteína del virus del mosaico del tabaco sería de 6 X 240 A, cuando en realidad es de 75 X 25 A. Por lo tanto, debemos imaginarnos que la espiral α se dobla y se enrosca de tal manera, que hace a la estructura más compacta aún. Además, debemos tomar en consideración que el grupo terminal amino de las proteínas completas, marcadas con DNF muestra que algunas de ellas contienen más de una cadena polipeptídica. Pensamos en una *estructura terciaria* como un plegado y torsión de la cadena polipeptídica, principalmente en la configuración de la espiral, para formar una estructura compacta.

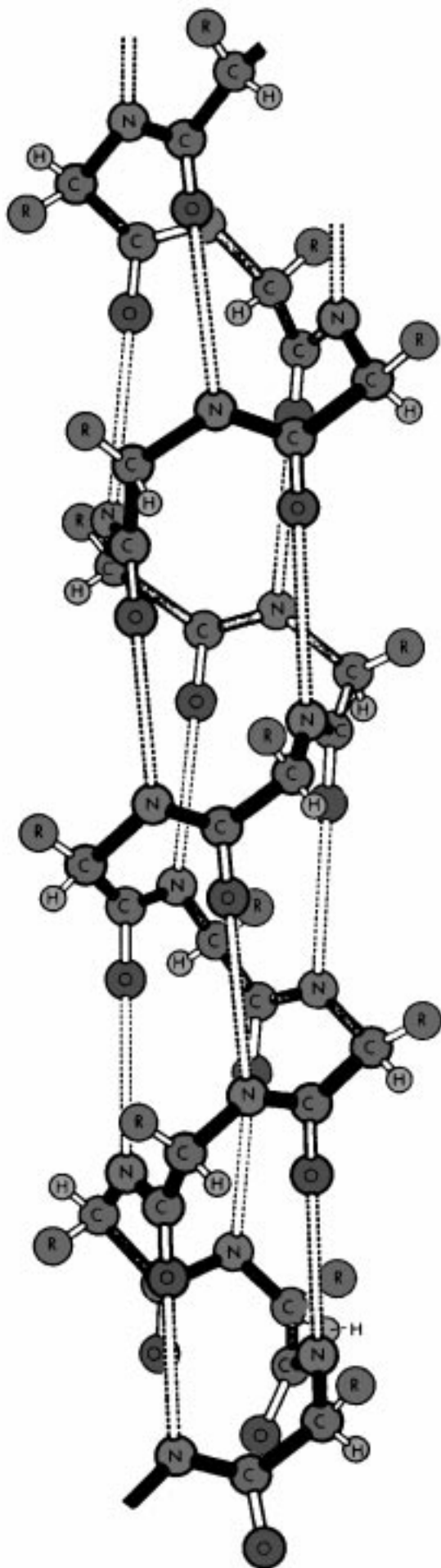


Fig. 8-11. Modelo de una espiral α , una configuración de la cadena polipeptídica, que se cree se encuentra en las proteínas. El eje de la cadena consiste de secuencias de C, C, N. R representa cadenas laterales de los diversos aminoácidos. Las líneas punteadas representan enlaces de hidrógeno que estabilizan a la espiral. (Reimpreso con permiso. Copyright (g) 1961 por *Scientific American Inc.* Todos los derechos reservados)

La asociación de dos o más unidades polipeptídicas compactas para formar la figura completa de la molécula proteica (en el caso en que halla más de un polipéptido en la molécula), se ha denominado, recientemente, *estructura cuaternaria*.

Las preguntas provocadas por las estructuras terciaria y cuaternaria de la proteína, no se han contestado por completo, ¿Qué propiedades de la cadena polipeptídica podrían explicar la estructura terciaria y cuáles la cuaternaria? Hasta ahora, hemos ignorado a los grupos R y hemos dicho que no son de importancia para la formación de la espiral α . Actualmente parece, sin embargo, que son en extremo importantes en la "conformación" o enrollamiento de la espiral α . Ciertos grupos R son capaces de interactuar unos con otros y, cuando esto sucede, se puede esperar que ayuden a estabilizar a una vuelta de la espiral a formando puntos de unión en ciertos lugares. La lista de interacciones específicas entre grupos R, no es todavía digna de confianza y completa, necesitándose, en fin, muchas adiciones y revisiones. La siguiente es una lista de cienos tipos de interacciones que se cree tienen lugar y que existen evidencias de ello en algunos casos.

(1) *Enlaces disulfuro*. El disulfuro es el único otro enlace covalente que con frecuencia se encuentra en las proteínas. Se forma cuando dos grupos -SH de cisteína reaccionan entre si de la siguiente manera:



Es interesante hacer notar que Sanger descubrió tres de tales enlaces en la molécula de la insulina, uno conectando dos porciones del mismo péptido y los otros dos, manteniendo juntos los dos péptidos de la molécula de insulina (Fig. 8-12). En la molécula de la ribonucleasa, por otra parte, solamente hay una cadena polipeptídica y cuatro grupos disulfuro formados dentro de ella .

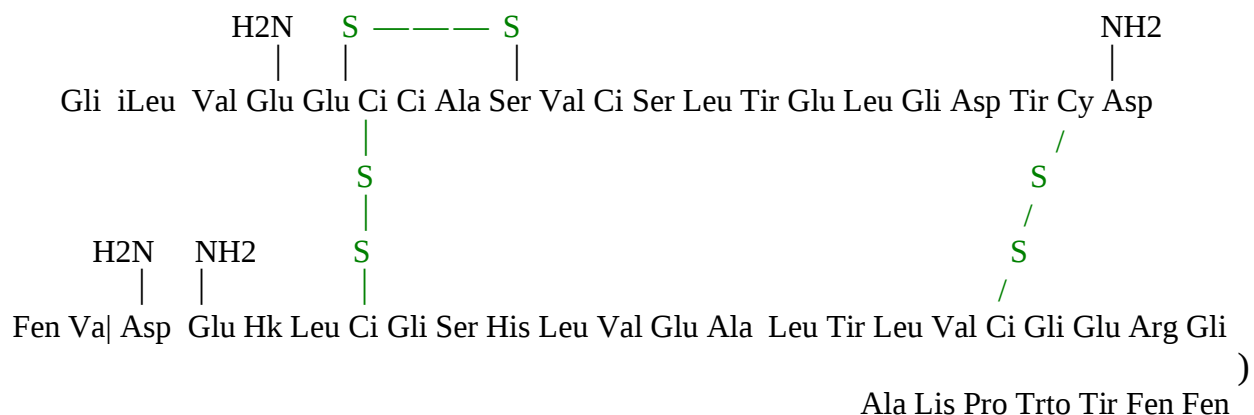


Fig. 8-12. Estructura de la insulina mostrando los enlaces disulfuro de intracadena y de intercadena (Sanger)

(2) *Enlaces de hidrógeno*. Hasta dónde los enlaces de hidrógeno entre los grupos R son responsables de la estructura terciaria y cuaternaria, es un tema debatido vigorosamente al presente. Hechos sustanciales señalan la formación de enlaces de hidrógeno entre los residuos tirosil e histidil y entre el seril y el aspartil.

(3) *Enlaces hidrofóbicos*. Una proporción sustancial (35 a 45%) de los grupos R de las proteínas, son de la variedad hidrofóbica no polares (valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, prolina, triptófano, alanina). Kauzmann ha sugerido que estas cadenas laterales no polares, tienen tendencia a eliminarse por si mismas del medio acuoso y luego se buscan para formar una o más "regiones hidrofóbicas" en la molécula. La fuerza que estabiliza esta interacción, no es solamente la llamada atracción de Van der Waal entre las cadenas laterales no polares, sino también es debida a la capacidad aumentada del agua alrededor de la molécula de la proteína para formar enlaces de hidrógeno a causa del retiro de grupos no polares de la fase acuosa.

(4) *Ligaduras salinas*. Puesto que en un pH fisiológico, los grupos R de la lisina y de la arginina están cargados positivamente y los de los ácidos aspártico y glutámico, negativamente, se ha sugerido que las ligaduras salinas pueden formarse entre ellos para estabilizar las estructuras terciaria y cuaternaria. La titulación de las proteínas y otros medios de evidencia sugieren, que de existir solamente una pequeña porción de los grupos cargados contribuyen para los enlaces estables no ocultos por la sal encontrada en las soluciones de proteínas. Se ha sugerido que unas cuantos ligaduras salinas *pueden* ser de importancia y estabilizarse por regiones hidrofóbicas cercanas, que las protegen de los efectos tamizadores de los iones en solución.

La investigación de Kendrew, Perutz y sus colaboradores, sobre la cristalografía por medio de los rayos X, de la mioglobina y de la hemoglobina, constituye el desarrollo más reciente y espectacular por lo que se refiere a la química estructural de la molécula proteica. De su trabajo, se está obteniendo gradualmente un conocimiento detallado y preciso de la estructura tridimensional de estas moléculas. No es posible aquí discutir con todo detalle el método de la cristalografía por medio de los rayos X empleado para la resolución de este problema, por lo que se recomienda al estudiante leer cuidadosamente el artículo de Kendrew sobre este asunto (véase la Lista de Lecturas que se Sugieren). Baste decir que estos investigadores tuvieron éxito al aplicar el llamado «método de reemplazamiento isomorfo», el cual implica la comparación de cristales de proteínas *con* cristales similares a los cuales se les había introducido metales pesados dispersores de electrones, en regiones específicas de la molécula de proteína. Esta comparación permite al cristalógrafo eliminar incertidumbres específicas y deducir la estructura directamente, sin suposiciones o tanteos, ni errores.

Kendrew fue capaz de construir un modelo completo de la molécula de la mioglobina a una resolución de 6 Å. A este nivel de resolución, uno puede ver una masa compleja en forma de *intestino*, *compuesta* de ocho trayectos de "salchichas" rectas, interrumpidas por curvaturas de diversos grados de profundidad (Fig. 8-13). La mioglobina es una proteína coloreada que contiene un grupo llamado hem,

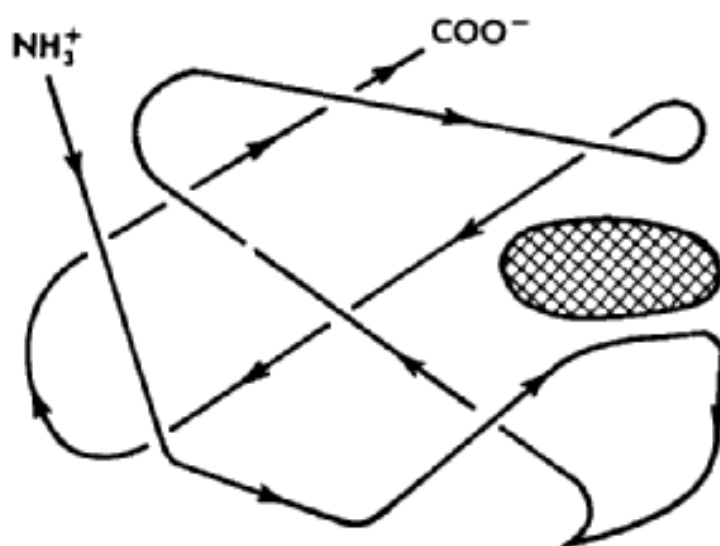


Fig. 8-13, Modelo de la mioglobina a una resolución de 6 A. El grupo hem es la sección plana sombreada de la parte superior derecha. (Fotografía de George Rodger. © 1963 Magnum Photos.

similar al que se halla en la hemoglobina, el cual es responsable del color y es el asiento de la propiedad de la proteína de combinarse con el oxígeno. La localización del grupo graso hem puede verse claramente en el modelo. Las "salchichas" resultan ser huecas y *tener* los mismos diámetros que la espiral α de Pauling.

En la actualidad está progresando el trabajo a una resolución de 1.5 Å. Esto implica hacer aproximadamente 600 veces más mediciones que con una resolución de 6 Å. Los cálculos son tan complejos y numerosos (se deben calcular las densidades de 100 000 electrones) que se necesitan las computadoras más rápidas. No obstante, se ha aprendido bastante a un nivel de resolución de 1.5 Å. Los trayectos rectos de las salchichas pueden definitivamente reconocerse como espirales α , una confirmación de la predicción de Pauling. Ha sido también posible reconocer una buena proporción de los restos de aminoácidos y por lo tanto obtener la estructura primaria. Han salido varias interacciones entre grupos R. Así, **Kendrew** fue capaz de determinar la proximidad de algunos grupos que previamente se habían hecho sospechosos de estar implicados en tales interacciones. Estos incluían a grupos capaces de formar enlaces de hidrógenos, salinos e hidrofóbicos. Suponiendo que es posible la extrapolación de moléculas de proteína en cristales a moléculas de proteína en solución, es posible que se pruebe que estos datos son cada vez más importantes para el entendimiento de cómo las estructuras terciaria y cuaternaria están estabilizadas.

Estamos solamente en los principios de este avance asombroso para la comprensión de la estructura de la proteína y podemos esperar bastante de este acontecimiento. La biología molecular de la célula se comprenderá algún día en términos de las interacciones precisas entre las diversas moléculas que la componen. Siendo las proteínas el material estructural así como los reguladores catalíticos de la célula, juegan un papel crucial en todas las interacciones de ellas, sean éstas, interacciones entre proteína-proteína, proteína-ácido nucleico, proteína-lípido, o enzima-sustrato. A fin de comprender a éstas en detalle, necesitaremos una visión muy exacta de la molécula de la proteína. El progreso en este campo es una revolución científica de primera magnitud que tenemos el privilegio de observar de muy cerca.

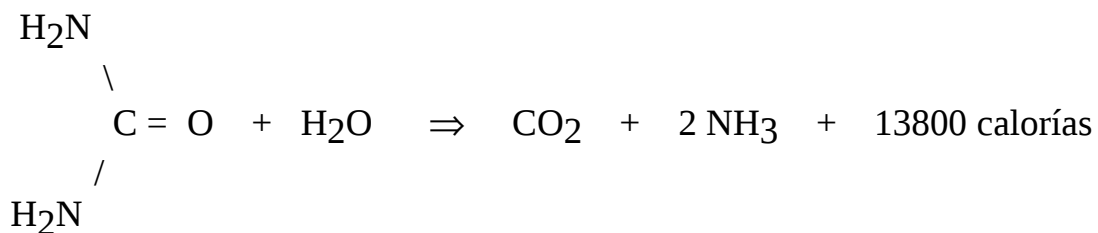
LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

- Edsall, J. T., and Wyman, J., *Biophysical chemistry*. New York: Academic Press.
- Haurowitz, F., 1950. *Chemistry and biology of proteins*. New York: Academic Press.
- Kendrew, J. D., "Three-dimensional study of a protein," *Scientific American*, December 1961.
- Neurath, H., and Bailey, K., 1953-1954. *The proteins*. New York: Academic Press.
- Pauling, L., Corey, R. B., and Bragg, R., "The structure of protein molecules," *Scientific American*, July 1954.
- Stein, W. H., and Moore, S., "The chemical structure of proteins," *Scientific American*, 1961.
- Thompson, E. O. P., "The insulin molecule," *Scientific American*, May 1955.

CAPITULO NUEVE

LA CATALISIS DE ENZIMAS, MECANISMO DE CONTROL BIOLOGICO

Dijimos en el Cap. 6, que la mayoría de los compuestos orgánicos de la célula son notablemente estables a temperaturas, presiones y concentraciones de iones hidrógeno fisiológicas. Si se disuelve urea en agua, por ejemplo, no reacciona con su solvente en proporción apreciable aun que si lo hiciera se pondría en libertad una considerable cantidad de energía.



La explicación de Eyring es que la urea y el agua no reacciona en proporción apreciable debido a que la reacción tiene que pasar a través de un "complejo activado", cuya formación toma una gran cantidad de energía (Fig. 9-1). Así, para que se forme el complejo activado, las moléculas de agua y de urea deben chocar con cierta cantidad mínima de energía. Como se muestra en la Fig. 9-2, solamente un número infinitesimal de moléculas de urea y de agua tienen esta cantidad mínima de energía a la temperatura ambiente. Aumentando la temperatura, una mayor proporción de moléculas obtendrán esta energía mínima y la velocidad de la reacción aumentar proporcionalmente. Esto es lo que hace el químico laboratorista de orgánica aunque él también, algunas veces, varia la presión y utiliza extremos de acidez y alcalinidad con el fin de activar la velocidad de las reacciones orgánicas. Pero la célula efectúa sus reacciones a temperaturas moderadas, bajas presiones y baja acidez y alcalinidad, a menudo, en proporciones a considerables velocidades. Además, la célula es capaz de *controlar* estas reacciones y de sincronizarlas unas con respecto a otras. Estos misteriosos poderes de la célula se deben a la catálisis biológica específica efectuada por las enzimas.

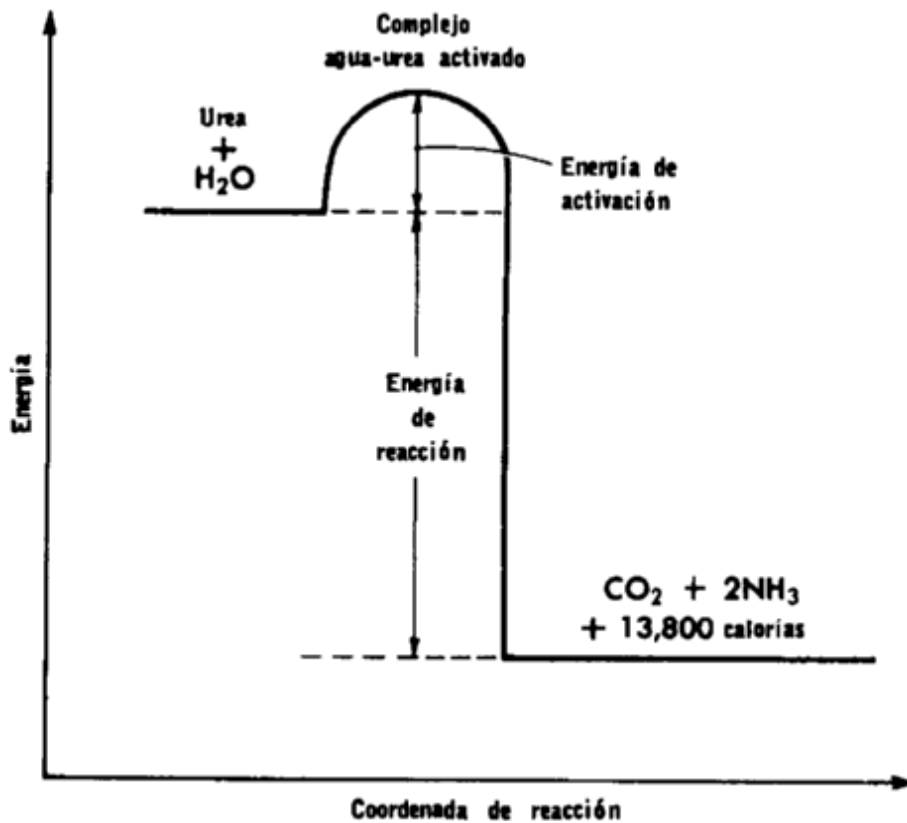
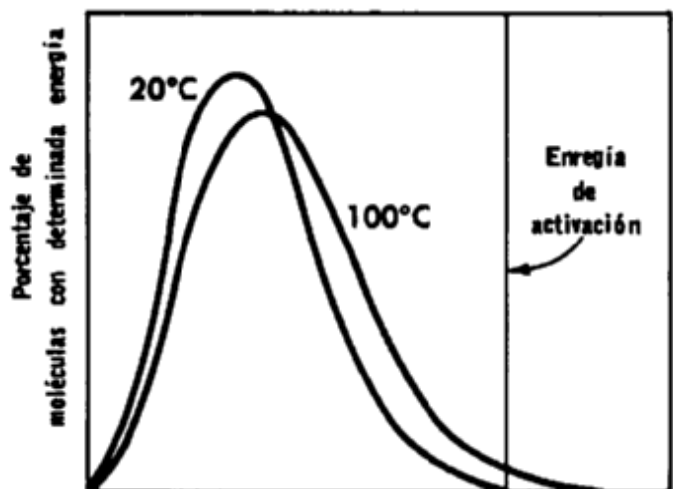


Fig. 9-1. Representación esquemática de las energías de la hidrólisis de la urea. A fin de que reaccione una molécula de urea con el agua, debe tener suficiente energía para formar un complejo agua-urea activado

Fig. 9-2. Distribución de la energía de la urea en agua a dos temperaturas, en relación con la energía de activación necesaria para la hidrólisis de la misma. A 100 °C, una proporción mayor de moléculas tienen energías iguales, o mayores que la energía de activación



La catálisis fue definida por los químicos van't Hoff y Ostwald como el aumento de la velocidad de una reacción sin afectar los resultados totales de la misma. Trabajos posteriores han puesto en claro que la sustancia catalítica si reacciona con el "substrato" y que es regenerada al final de la reacción en su forma original. Esto capacita a la sustancia catalítica a efectuar muchos ciclos de reacción y explica por qué es efectiva en concentraciones sumamente bajas. El complejo substrato-sustancia catalítica tiene una energía de formación más baja que la de los

intermediarios "activados" de la reacción no catalizada, permitiendo así que mayor número de moléculas reaccionen a determinada temperatura (Fig. 9-3). Se debe hacer notar que puesto que la formación del intermediario sustancia catalítica-substrato es temporal, no teniendo nada que ver con los estados inicial y final, no tiene absolutamente ningún efecto sobre el equilibrio de la reacción. Las sustancias catalizadoras no son genios termodinámicos capaces de aumentar las reacciones. Ellas no hacen cambiar los equilibrios, sino solamente aumentan la velocidad con la cual se alcanza ese equilibrio.

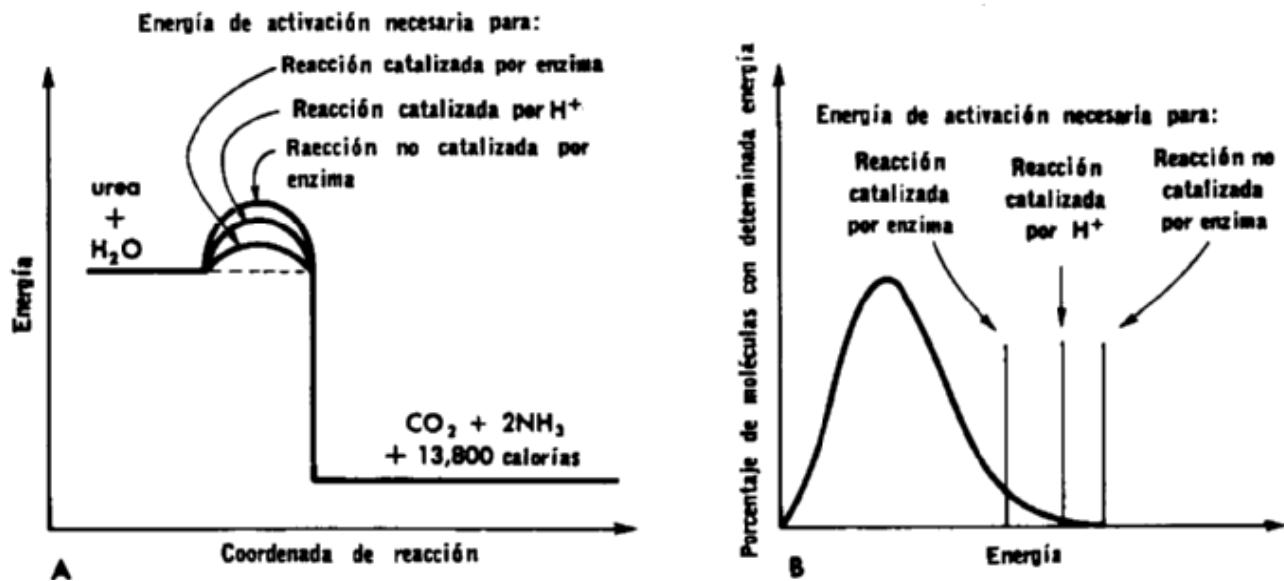


Fig. 9-3. A: Representación esquemática mostrando que una reacción catalizada por enzima tiene una energía más baja de formación del complejo activado que las reacciones catalizadas por H⁺ o las sin catalizar. B: Representación esquemática mostrando el efecto de la menor energía de activación sobre el número de moléculas con suficiente energía para formar el complejo activado

La catálisis biológica efectuada por enzimas obedece a las mismas reglas generales observadas en las catálisis no enzimáticas. Difiere de otras formas de catálisis, principalmente, en la mayor efectividad para hacer descender la barrera de energía de activación (véase Fig. 9-3) y en el extraordinario grado de especificidad exhibido. Aquí reside una clave del delicado control de los procesos celulares que ejercen las enzimas. Este control es posible debido a que las enzimas pueden actuar a concentraciones muy bajas y con un elevado grado de especificidad. Regulando el abastecimiento de pequeñas cantidades de enzima activa, la célula puede controlar el flujo metabólico de los compuestos dentro de ella. Así, la función de la catálisis biológica no es sólo el incremento de la velocidad de las reacciones químicas, sino que también las regula, lo cual es, quizás más importante. Para comprender su capacidad reguladora debemos primeramente estudiar las propiedades generales de las enzimas.

ANALISIS ENZIMATICO

La bioquímica moderna debe sus éxitos a la especificidad de la acción enzimática. Esta, en la práctica, nos permite mezclar un sustrato purificado con preparaciones de enzimas que podrían contener 1000 veces más impurezas, y obtener un análisis cuantitativo de la cantidad de enzima presente. La razón para esto, como lo hemos indicado, es que la enzima puede ignorar todos los compuestos extraños y catalizar específicamente las reacciones de su sustrato. Es posible, por ejemplo, moler algunas semillas de *Canavalia ensiformis** y añadir esta preparación impura a urea purificada. La hidrólisis de la urea se puede observar, midiendo la producción de amoníaco con un análisis químico apropiado (Fig. 9-4). La práctica, generalmente empleada, es dibujar una tangente a la curva con su origen en tiempo cero. La pendiente de esta línea se llama la velocidad inicial de la reacción y está en relación con la concentración enzimática. Para estimar la pureza de una preparación enzimática, se divide la velocidad inicial por la cantidad total de proteína presente. Esta medida se llama la *actividad específica* y aumenta a medida que las etapas siguientes de purificación, proporcionan una preparación enzimática más pura. Cuando la actividad específica ya no puede aumentar más allá de cierto límite, aunque se haya empleado un amplio rango de procedimientos de purificación, se supone, generalmente, que la enzima se encuentra pura. Este puede o no ser el caso, dependiendo del criterio para juzgar la pureza.

NATURALEZA PROTEICA DE LAS ENZIMAS

El procedimiento general que acabamos de delinear, fue empleado por Sumner, el cual, en 1926, fue el primero en cristalizar una enzima, la ureasa. Este resultado fue especialmente notable porque se verificó en una época en la cual todo fenómeno de catálisis biológica se encontraba rodeada de una atmósfera de temor. Los cristales de ureasa que obtuvo Sumner, resultaron estar constituidos por proteína, pero debido al prestigio del gran químico Willstätter, quien se oponía a la noción de que las enzimas fueran "meras" proteínas, hubo necesidad de más experimentos para que se aceptara la naturaleza proteica de las enzimas. Por el año de 1956, se habían cristalizado alrededor de 75 enzimas y muchas más se habían purificado, encontrándose que todas contienen proteínas. Quizás la prueba más convincente de la naturaleza proteica de las enzimas es el experimento, frecuentemente repetido, que se hace tratando una enzima determinada con una enzima digeridora de proteínas (proteínasa).

**Canavalia ensiformis* es el nombre científico que se le da a la planta denominada erísimo, que es una planta de la América tropical, herbácea, anual, semirecta, que posee grandes vainas conteniendo semillas, se emplean como forraje. (N. del T.)

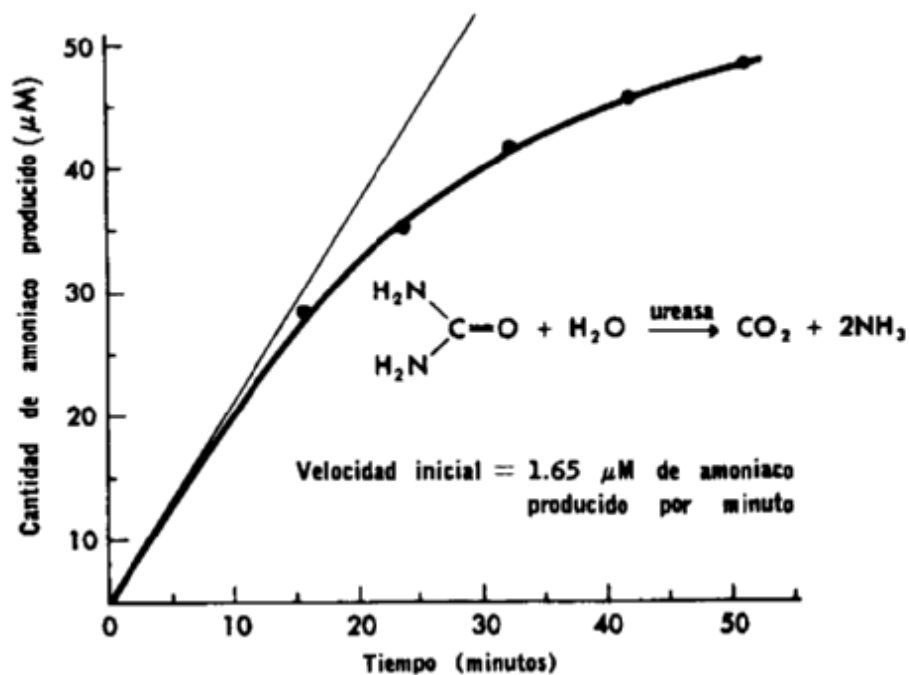


Fig. 9-4. Velocidad de producción de amoniaco por la acción de la ureasa sobre la urea y agua. La pendiente de la línea recta representa la velocidad inicial la enzima se encuentra pura. Este puede o no, ser el caso, de pendiendo del criterio para juzgar la pureza.

Se puede demostrar que la pérdida de la actividad de la enzima va paralela con la desaparición de proteína. Es posible también demostrar un paralelismo entre la desnaturalización de la proteína, ocasionada por diversos agentes, y la pérdida de la actividad de la enzima.

En los últimos años, se han hecho reportes de ensayos ocasionales acerca de la actividad enzimática de preparaciones que no contienen proteína. Sin embargo, ninguno de estos ensayos se ha repetido completamente o se ha comprobado y por lo tanto, se debe sacar por conclusión que la naturaleza proteica de las enzimas está completamente establecida.

El hecho de que las enzimas sean proteínas tiene varias consecuencias relacionadas con sus propiedades. Una de éstas es el efecto de la temperatura sobre la acción de la enzima. La Fig. 9-5 muestra que este efecto tiene dos componentes: una curva con una pendiente positiva que es causada por el efecto de la temperatura sobre una reacción química (véase Fig. 9-2) y otra curva con una pendiente negativa muy pronunciada que es debida al efecto de la temperatura sobre la desnaturalización de la enzima.

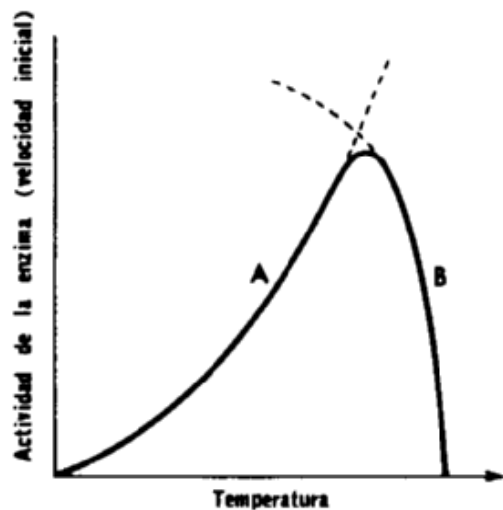


Fig. 9-5. El efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas. La curva está compuesta de dos procesos. A es el efecto de la temperatura sobre la reacción catalizada por enzimas. B es el efecto de la temperatura sobre la velocidad de la desnaturalización de la enzima.

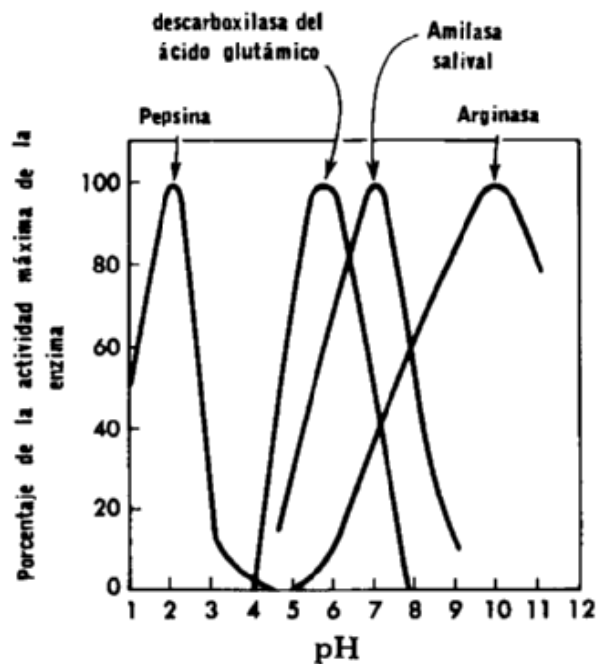


Fig. 9-6. Efecto del pH sobre la actividad de varias enzimas (Copiado de J.S. Fruton y S. Simmonds, General Biochemistry, Wiley, 1953. Con autorización)

Este efecto notable de la temperatura sobre la desnaturalización es una propiedad única y característica de las proteínas y de los ácidos nucleicos.

Puesto que las proteínas son iones polivalentes, cargados positiva y negativamente, son muy sensibles a los cambios del pH, el cual no solamente cambia la disociación de ciertos grupos R que se supone están implicados en el proceso catalítico, sino que se ha demostrado que también ocasiona cambios estructurales de mayor alcance en la molécula de la proteína.

A causa de este doble efecto, las enzimas exhiben un pH óptimo muy definido, el cual se presenta en un rango de valores de pH relativamente amplio (Fig. 9-6).

Por diversas razones, las enzimas no siempre se encuentran en un estado activo. Algunas enzimas, entre ellas las proteolíticas, o variedad de enzimas digeridoras de proteínas, se hallan, a menudo, en la célula como precursoras inactivas. El tripsinógeno, por ejemplo, es inactivo, pero se puede activar a tripsina con diversas enzimas, incluyendo a la tripsina misma. Parece que la activación implica la supresión de un corto péptido, seguida de algunos cambios estructurales en la molécula de la proteína, que finalmente conducen a la enzima tripsina activa. Otras enzimas, como ya dijimos en el Cap. 4, requieren para su actividad, ciertos cationes divalentes como el Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} o Co^{2+} . Otra categoría de enzimas

requieren como "coenzima", un compuesto orgánico complicado. Tanto el catión divalente como la coenzima, se pueden separar generalmente de la enzima, por medio de la diálisis.

Este procedimiento consiste en poner a la proteína dentro de una bolsa de celofán con poros demasiado pequeños para permitir el paso de la enzima a través de ella y sumergiéndola en grandes volúmenes de agua o de solución salina. La coenzima es capaz de pasar a través de los poros de la bolsa de diálisis y diluirse en el gran volumen exterior de la solución. Por regla general, la coenzima es estable en agua hirviendo, en tanto que la apoenzima, o sea parte proteína de la enzima activa, es inactivada por el calor. Por lo tanto, la dializabilidad y la estabilidad al calor son las pruebas usuales para la coenzima. Algunas enzimas, sin embargo, contienen una porción no proteica que está lo suficientemente bien unida, de manera que no se puede quitar por medio de la diálisis. Esta porción no proteica, denominada *grupo prostético*, juega un importante papel en la interacción entre la enzima y el sustrato.

EL COMPLEJO SUBSTRATO-ENZIMA

Si la actividad de una enzima se mide a diferentes concentraciones del sustrato (Fig. 9-7A) y si la velocidad de la reacción se gráfica contra la concentración del sustrato, se obtiene una curva como la dibujada en la Fig. 9-7B. A medida que la concentración del sustrato aumenta, el valor de v se aproxima a una velocidad límite V . A esta velocidad, la actividad de la enzima es proporcional a la concentración de la misma.

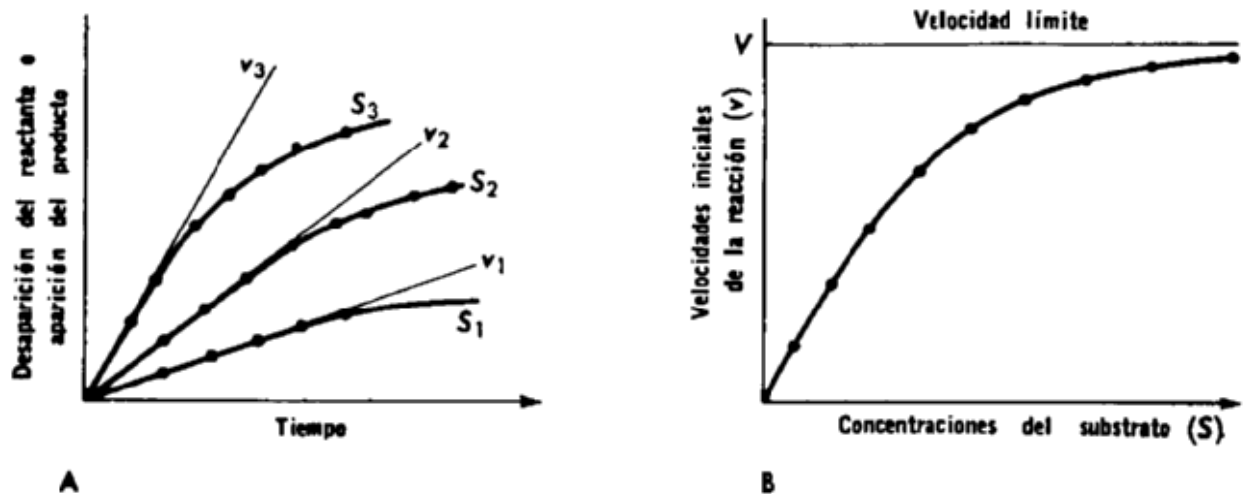


Fig. 9-7. A: Velocidades iniciales de las reacciones (v_1 , v_2 , v_3) en tres concentraciones sustratos (S_1 , S_2 , S_3). B: Curva obtenida cuando las velocidades iniciales de las reacciones catalizadas por enzimas, a diferentes concentraciones de sustrato se grafican contra las concentraciones del sustrato. La velocidad límite (V) es la velocidad inicial a una concentración "infinita" del sustrato.

Para explicar estas relaciones, Henri (1920) sugirió primero que la enzima y el substrato se combinan la una con el otro.

Así se puede ver en el terreno cualitativo, que solamente cuando la concentración del substrato es lo bastante elevada para mantener a la enzima completamente ocupada en el proceso catalítico, tiene lugar la proporcionalidad entre la actividad de la enzima y la concentración de la misma. Michaelis y Menten (1913) lograron validar el adelanto de Henri en términos cuantitativos. Comenzaron su formulación suponiendo que *la ley de la acción de las masas* era aplicable a la formación de un complejo substrato-enzima y obtuvieron la siguiente relación:

$$V = \frac{V \bullet [S]}{K_m + [S]}$$

en donde V= velocidad de la reacción enzimática

V = el límite o velocidad máxima a una concentración "infinita" del substrato

[S] = la concentración del substrato en moles por litro de solución

K_m = la constante de Michaelis en moles por litro de solución

Si se grafica la ecuación de Michaelis-Menten (Fig. 9-8) se obtiene una hipérbola rectangular con una forma muy similar a la curva experimental mostrada en la Fig. 9-7B. Esta, en si misma, es una validación experimental precisa del complejo substrato-enzima supuesto de la derivación. En la actualidad existe mucho más evidencia espectroscópica directa de la existencia del complejo substrato-enzima.

La curva de la Fig. 9-8 muestra, como puede comprobarse por medio de una simple sustitución algebraica, que a una velocidad de la mitad del valor límite, [S] es igual a K_m.

Aunque K_m no es una medida estricta de la afinidad entre la enzima y el substrato, es, no obstante, una aproximación burda de ella. De la Fig. 9-8 se puede ver que cuanto más bajo es el valor de K_m - esto es, cuanto más empinada es la pendiente de la curva - mayor es la afinidad aproximada entre la enzima y el substrato.

ESPECIFICIDAD DE LA ACCION DE LA ENZIMA

La especificidad es, quizás, la propiedad más característica de la máquina viviente.

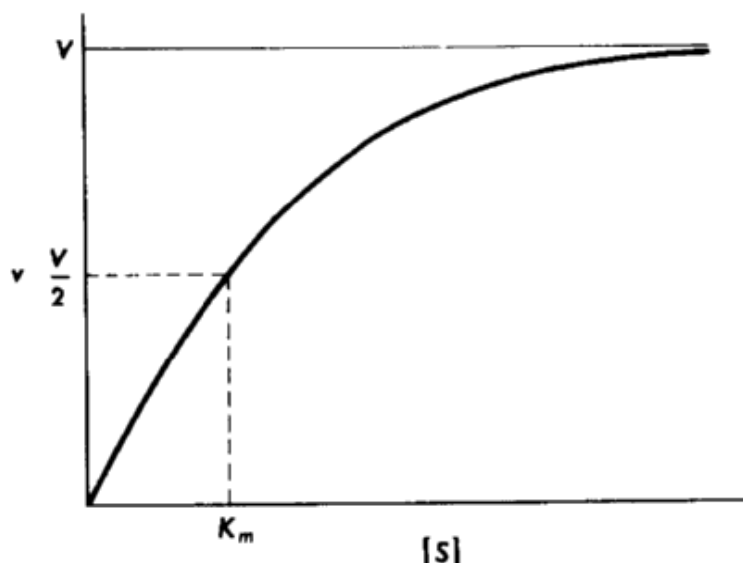
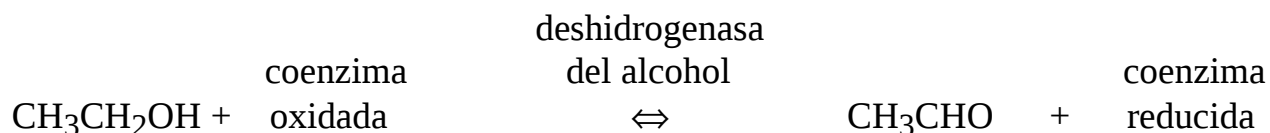


Fig. 9-8. Curva obtenida graficando la ecuación de Michaelis-Menten. Obsérvese que la forma de la curva es muy similar a la de la curva experimental mostrada en la Fig. 9-7B.

La relación entre el substrato-enzima es un importante ejemplo de este fenómeno. El grado de especificidad de la enzima varia hasta cierto límite.

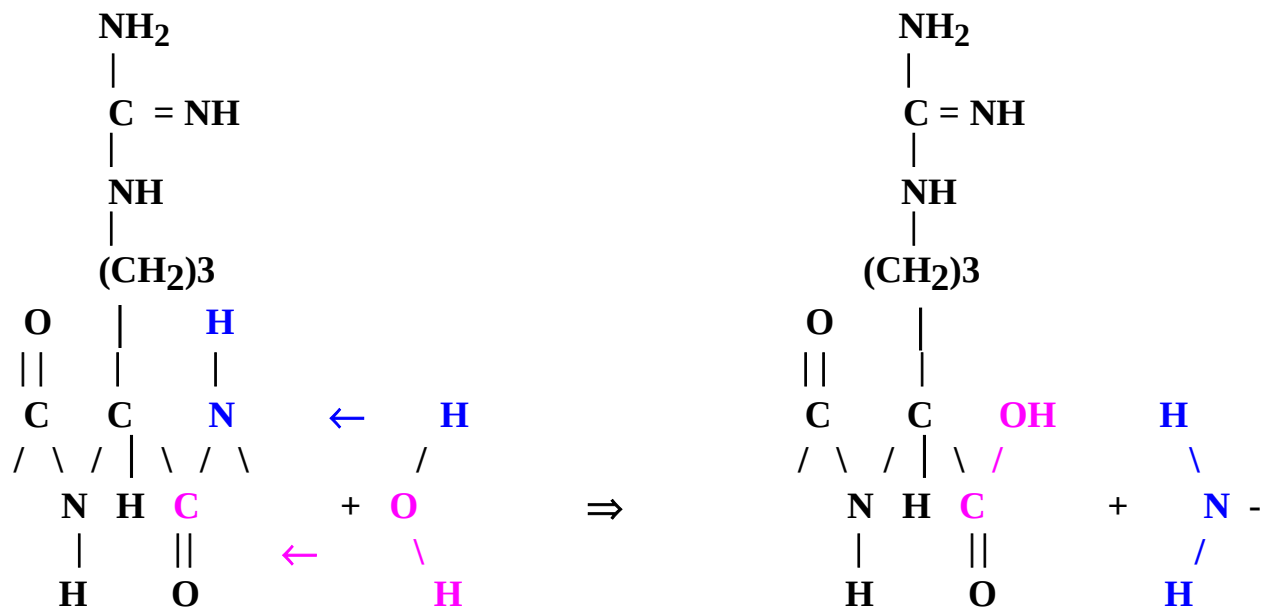
La *especificidad absoluta*, como lo indica su nombre, significa que la enzima puede catalizar la descomposición de solamente una sustancia. La hidrólisis de la urea por medio de la ureasa es un ejemplo de esto. Cualquier débil modificación química de la molécula de urea, le impide completamente ser un substrato.

La *especificidad de grupo absoluta* implica que la enzima puede obrar sobre determinado grupo orgánico solamente. Así, las deshidrogenasas alcohólicas actuarán solamente sobre los alcoholes.



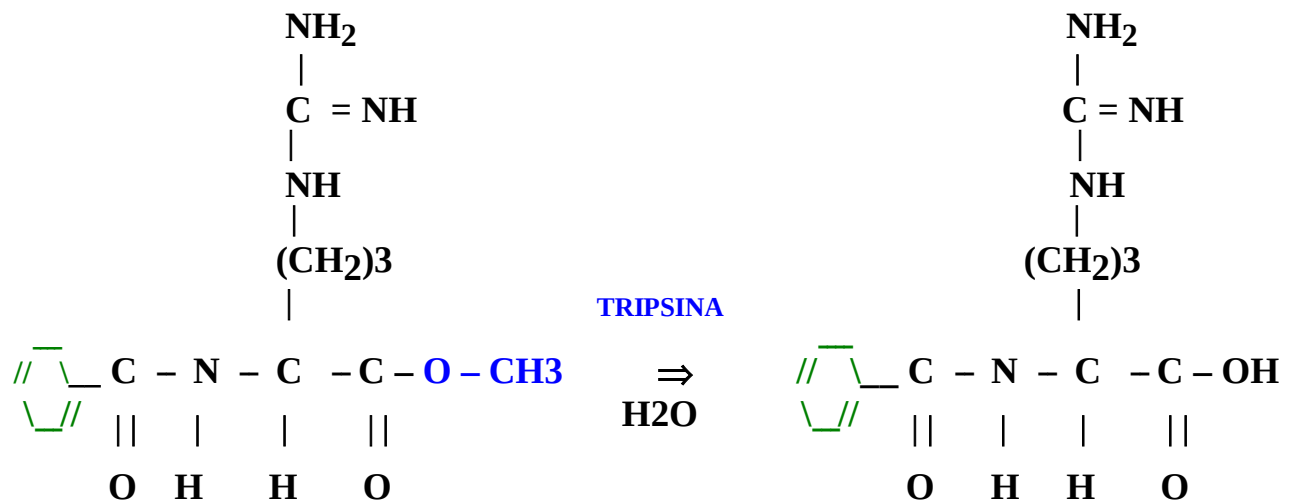
En tales casos, la intensidad de la actividad de la enzima dependerá de la naturaleza de las porciones restantes de la molécula. En el caso de la deshidrogenasa del alcohol, la enzima "prefiere" al etanol, pero puede actuar con intensidades decrecientes sobre alcoholes de cadena recta de longitudes crecientes.

La especificidad de grupo relativa se refiere a la propiedad de las enzimas que les permite actuar sobre más de un grupo orgánico. Así, la tripsina que es capaz de romper ciertos enlaces peptídicos comprendiendo a los residuos de lisina o arginina, es también capaz de romper sus enlaces éster.



residuo
de arginina

actividad peptídica de la tripsina

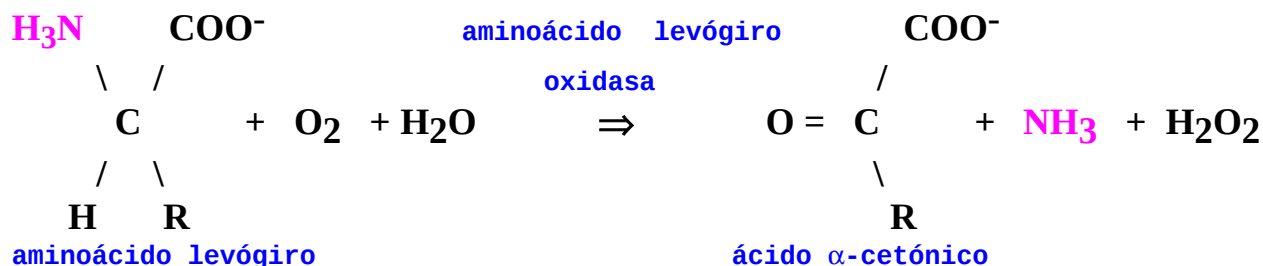


éster metílico de la benzol-L-arginina

+ CH₃OH
benzol-L-arginina + metanol

actividad esterasa de la tripsina

La especificidad óptica es, quizá, el ejemplo más dramático de la capacidad de una enzima para discriminar entre substratos relacionados. Aunque en otros aspectos pueda clasificarse en una de las tres clases anteriores, una enzima es capaz también de discriminar entre un substrato dado y su isómero óptico. Una oxidasa de un aminoácido levógiro, por ejemplo, no reacciona sobre aminoácidos dextrógiros y viceversa.



Estos y otros numerosos estudios sobre la especificidad de la enzima nos han proporcionado cierta comprensión sobre el mecanismo de la acción de la enzima. Antes de que estemos preparados para discutir este importante tópico, debemos repasar otra propiedad de las enzimas que es crucial para la comprensión de la acción de la enzima.

INHIBICION DE LA ENZIMA

Como señalamos en el Cap. 4, podemos esperar que los venenos ejerzan su efecto biológico sobre las enzimas; ya que solamente a través de una inhibición de la catálisis, podemos explicarnos por qué los venenos tienen tales efectos drásticos a concentraciones pequeñísimas. Grafiquemos la ecuación de Michaelis Menten en una forma un poco diferente (Fig. 9-9).

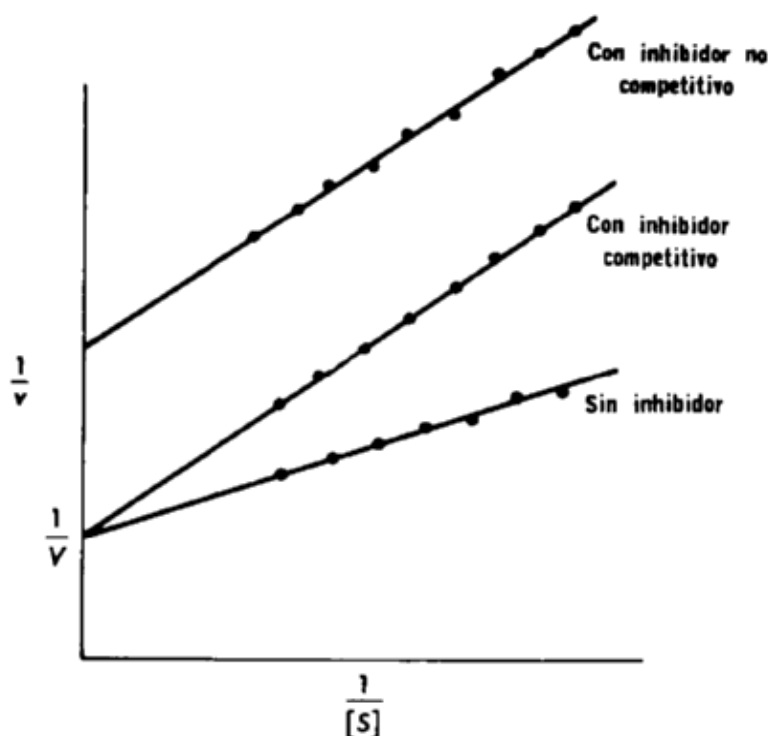
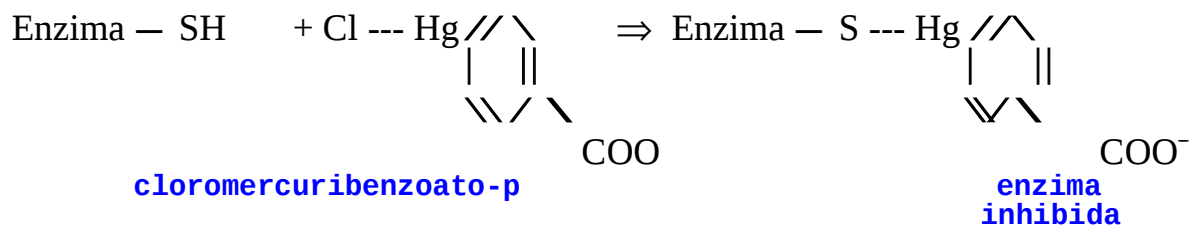


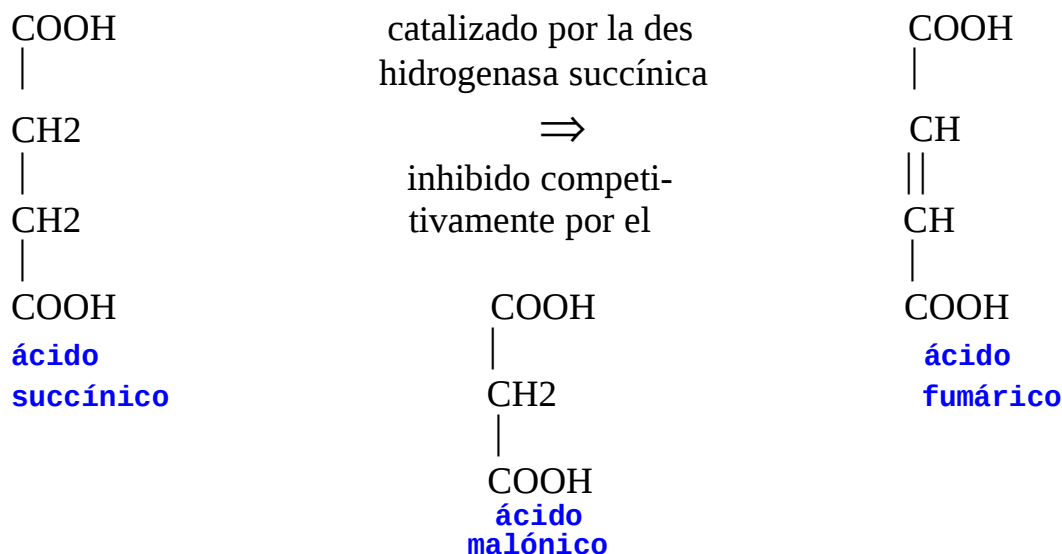
Fig. 9-9. La graficación recíproca ($1/v$ contra $1/[S]$) da líneas rectas, las cuales por extrapolación revelan diferencias entre la inhibición competitiva y la no competitiva. Obsérvese que al graficar $1/v$ contra $1/[S]$, se obtiene una línea recta que intercepta al eje $1/v$ en $1/V$. Esto nos proporciona un medio conveniente y exacto para calcular V .

La pendiente resulta ser K_m/V y, por lo tanto, K_m puede calcularse, también, muy convenientemente. La Fig. 9-9 muestra que dos tipos de inhibición de enzimas se

pueden distinguir. Uno de ellos, llamado no competitivo, está caracterizado por el hecho de que la acción del inhibidor sobre la enzima, no se modifica por algún cambio en la concentración del sustrato. Así, a una concentración infinita de sustrato, uno es todavía capaz de medir alguna inhibición de la enzima, es decir, las curvas inhibidas y las no inhibidas, no se interceptan en $1/[S] = 0$. La inhibición no competitiva incluye muchos efectos químicos sobre la enzima que tienen un efecto directo o indirecto sobre su actividad. Un ejemplo de esto podría ser el cubrimiento sobre la enzima de uno o más grupos sulfidrilos que son necesarios para su acción.



En la inhibición competitiva, el efecto del inhibidor se reduce, aumentando la concentración del sustrato. Aquí el efecto inhibitor casi desaparece cuando la concentración del sustrato llega a ser infinita. Así, las dos líneas se interceptarán en $1/[S] = 0$. Esa conducta se puede explicar, suponiendo que el inhibidor compite reversiblemente con el sustrato por una porción de la enzima que está directamente implicada en el proceso catalítico. El efecto del ácido malónico como un inhibidor competitivo de la reducción del ácido succínico, es un ejemplo clásico de la inhibición competitiva (véase Cap. 11).



El inhibidor competitivo es suficientemente similar al sustrato real, como para formar un complejo enzima-inhibidor, aunque se diferencia del sustrato en que impide a la enzima de actuar catalíticamente sobre él. En presencia de un inhibidor,

una parte de la enzima está "atada" y no puede actuar catalíticamente, un efecto que puede disminuirse, aumentando la concentración del sustrato.

Otro ejemplo bien conocido de esto, es el efecto de la sulfanilamida (una droga sulfa), que "engaña" a la enzima que actúa normalmente sobre el ácido p-aminobenzoico, un importante factor de crecimiento para muchas bacterias.



Obsérvense otra vez, las similitudes estructurales generales entre los dos compuestos.

MECANISMO DE LA ACCION ENZIMATICA

La discusión hasta ahora nos conduce a la conclusión general de que la catálisis enzimática implica la interacción íntima de ésta y del sustrato. El hecho de que los cambios estructurales de la molécula de la enzima (desnaturalización) ocasionan descensos notables en la actividad de la enzima, sugiere que esta requiere unas estructuras secundaria, terciaria y posiblemente hasta cuaternaria específicas para su propiedad catalítica. El fenómeno de la especificidad óptica sugiere que, a lo menos en algunos casos, tres o cuatro sustitutos del átomo de carbono ópticamente activo, deben estar en contacto con la superficie de la enzima (Fig. 9-10).

Una relación íntima entre la enzima y el sustrato, también se ha sugerido, aunque en una forma un tanto indirecta, por el fenómeno de la inhibición competitiva.

Esta noción de una relación íntima entre una región determinada de la enzima y ciertos grupos de la molécula del sustrato, ha conducido al concepto del sitio activo. De acuerdo con este concepto, existen una o más regiones en la enzima, en las cuales se verifican las transformaciones catalíticas. Cuál es la naturaleza del sitio activo? Aunque el estudio del sitio activo de las enzimas apenas ha comenzado a hacerse, existen varias observaciones interesantes que señalan la dirección en la cual podemos esperar hacer algún progreso.

Existen las llamadas enzimas conjugadas, en las cuales, los "**grupos prostéticos**" son necesarios para la actividad de la enzima. Puesto que nosotros podemos esperar que el grupo prostético sea, al menos parte del sitio activo de la enzima, tenemos la oportunidad de estudiar la química estructural de esta región.

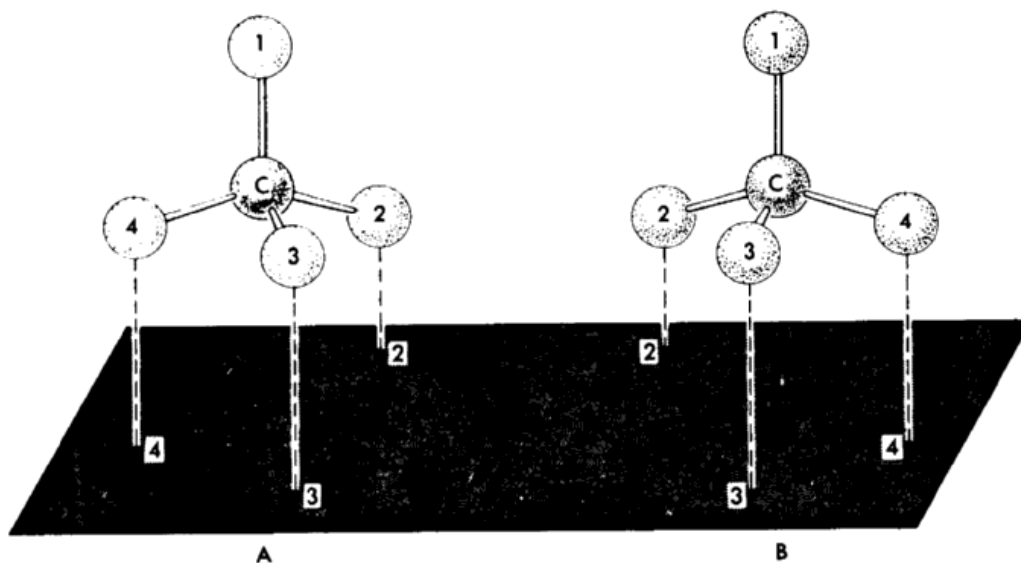


Fig. 9-10. Demostración de que la especificidad óptica puede ser debida al contacto de tres puntos como mínimo. El contacto de dos puntos no puede distinguir entre los isómeros ópticos A y B

Wang llevó a cabo un estudio interesante sobre la catalasa, la enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. La catalasa tiene un grupo prostético compuesto por un átomo de hierro y un grupo hem (hematina). Es posible medir los efectos catalíticos del hierro solo (débil) y de la hematina (menos débil); la conclusión, como podía esperarse, es que la porción proteínica de la enzima si desempeña un papel crucial en la catálisis (Fig. 9-11). Es muy probable que el grupo hematina esté colocado sobre la enzima de tal manera que el sustrato interacciona con porciones de la molécula de la proteína como también con el grupo prostético.

Una hipótesis alternativa supone que la interacción de la proteína y de la hematina modifica las propiedades de la última, de tal manera, que aumenta su actividad catalítica. Wang fue capaz de sintetizar un compuesto (la trietilentetramina férrica) que es un catalizador mucho más efectivo que la hematina, pero mucho menos que la enzima (Fig. 9-11). Colocando los grupos NH_2 junto al hierro, este compuesto posiblemente simula la situación del hierro en el complejo proteína-hematina de la catalasa. Tales estudios de la actividad catalítica de análogos de la enzima serán probablemente, de una importancia cada vez mayor, en un futuro próximo.

Otro enfoque que han proporcionado recientemente algunos resultados interesantes es el haber quitado porciones de la molécula de la enzima, por medio de un rompimiento selectivo de enlaces específicos peptídicos con ciertas enzimas proteolíticas (desdobladoras de proteínas). Emil Smith, y sus colegas, han tenido éxito en suprimir más de 100 residuos de aminoácidos de los 185 encontrados en la enzima papaina, sin suprimir la actividad. F. M. Richards, usando la acción de la enzima sutilisina sobre la enzima ribonucleasa, fue capaz de romper un péptido en

20 partes. Fue posible eliminar la actividad de la ribonucleasa, suprimiendo este péptido, y regenerar la actividad de la enzima, añadiéndoselo. Estudios como éstos proporcionar una imagen, cada vez más precisa, de la porción de la enzima que se necesita para la actividad catalítica.

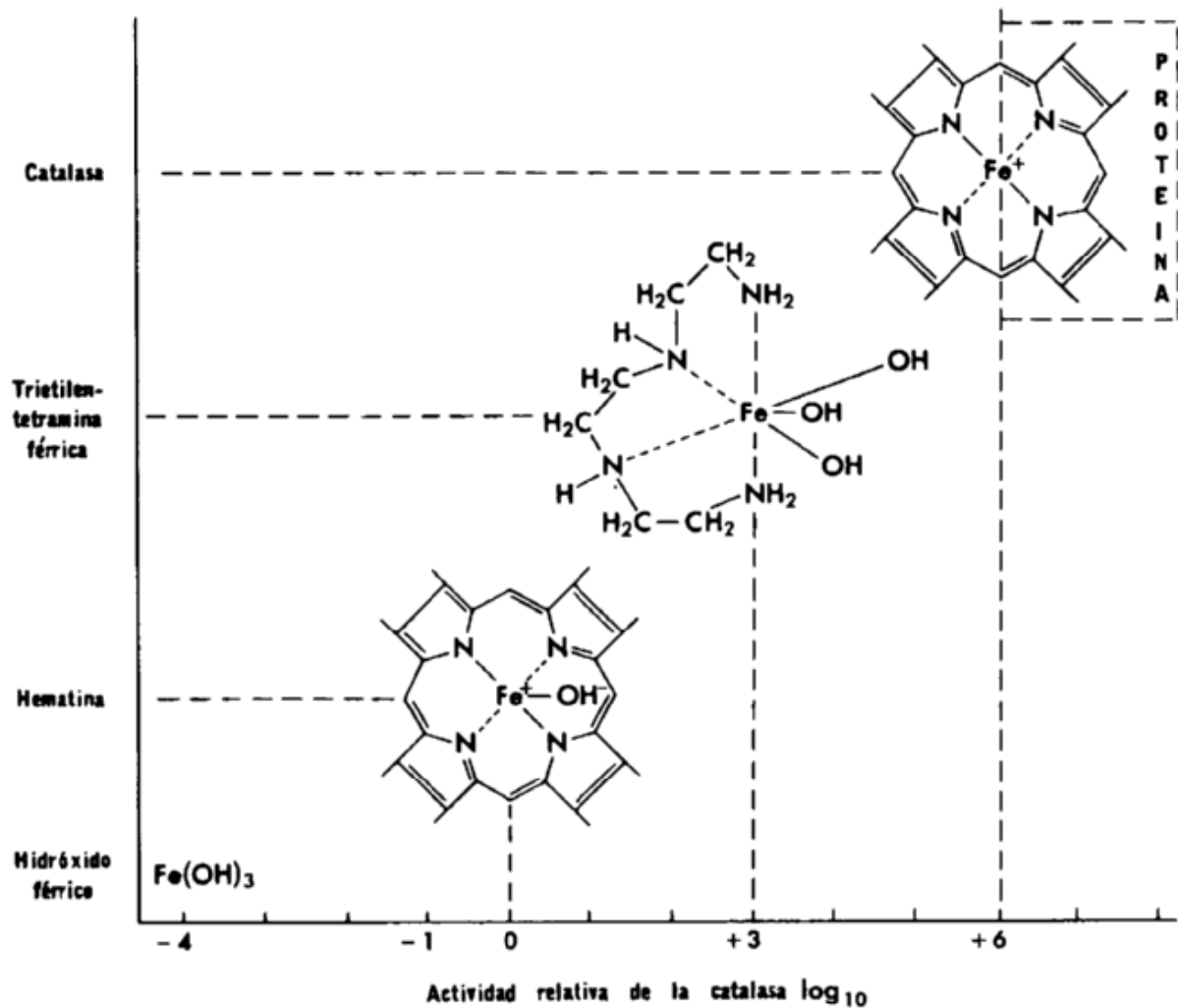
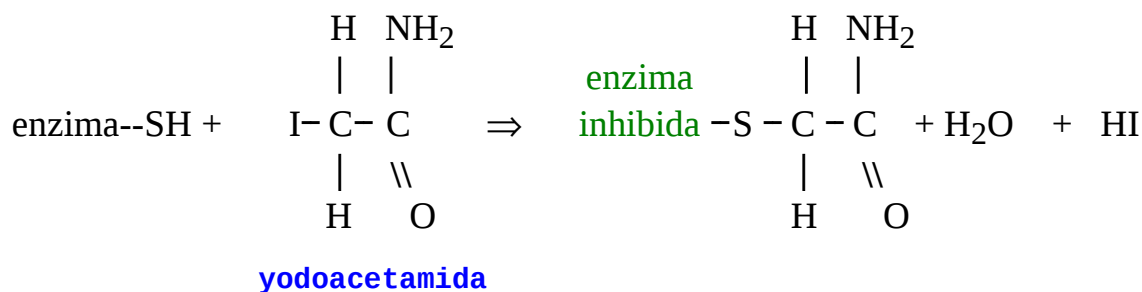


Fig. 9-11. Actividad catalítica ejercida por varios compuestos sobre la descomposición del peróxido de hidrógeno. (Cortesía de J. H. Wang)

Un enfoque que ha vuelto a emplearse en los últimos años, es el bloqueo específico de los grupos R en la molécula de la enzima. Se ha sabido, desde hace mucho tiempo, que ciertas enzimas necesitan para su actividad, la presencia de uno o más grupos sulfidrilos específicos. Cuando tales grupos llegan a unirse con un reactivo mercurial como el p-cloromercuribenzoato o con un reactivo alquilante como la yodoacetamida, entonces la actividad enzimática se pierde.



Un trabajo reciente sobre varias enzimas ha implicado algunos grupos adicionales como la histidina, el ácido aspártico, la tirosina y la serina; y podemos esperar que esta lista aumente rápidamente en un futuro inmediato. Quizás el ejemplo más excitante de este trabajo haya sido en conexión con ciertos grupos R que resultaron ser extraordinariamente reactivos. En el caso de la ribonucleasa, Barnard y Stein descubrieron que un grupo R de histidina localizado en la posición 119 (Fig. 8-13) es extremadamente reactivo para el ácido bromoacético.

Este reactivo no reacciona tan rápidamente con las otras tres histidinas de la molécula ni tampoco lo hace con la histidina en solución. Además -- y esto es de mayor significación -- la reactividad especial de la histidina 119 se pierde si se desnaturaliza a la ribonucleasa, puesto que es dependiente de la configuración específica de la enzima natural.

El panorama de la biocatálisis que se presenta, implica una relación estructural íntima entre la enzima y el substrato. La superficie específica o sitio de la enzima donde tiene lugar la unión temporal, se supone que está formada de grupos R traídos a una yuxtaposición rígida por medio del enrollamiento, plegamiento y asociación de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de la enzima, respectivamente. Se espera que la yuxtaposición de estos grupos, modifique su reactividad en cierta forma como para hacer del sitio activo, no solamente específico en su configuración espacial, sino también muy especial en su reactividad química. Un substrato que se une aunque sea temporalmente al sitio activo, queda sometido a esfuerzos violentos y, por lo tanto, es activado. Sea como fuere, tal es en la actualidad, nuestra manera de pensar, un tanto vaga si se quiere.

El mecanismo preciso por medio del cual una enzima baja su energía de activación, necesaria para una reacción determinada, está aún por descubrirse. No obstante, la dirección general de la investigación se ha vuelto precisa. Debemos tratar de conocer la química de la estructura tridimensional del sitio activo y posiblemente de toda la enzima. Con los nuevos desarrollos en la cristalografía por medio de rayos X y la precisión cada vez mayor de otras técnicas de análisis estructural, podemos decir, con seguridad, que esta meta está a nuestra vista.

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

BALDWIN, E., 1957. *Dynamic aspects of biochemistry*, 3d ed. Cambridge: Cambridge University Press.

BOYER, P. D., LARDY, H., and MYRBACK, K., 1959. *The enzymes*. New York: Academic Press.

COLOWICK S. P., and KAPLAN, N. O., 1955. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press.

FRUTON, J. S., and SIMMONDS, S., 1958. *General biochemistry*, 2d ed. New York: Wiley.

MEHLER, A. H., 1957. *Introduction to enzymology*. New York: Academic Press.

NEILANDS, J. B., and STUMPF, P. K., 1958. *Outlines of enzyme chemistry*, 2d ed. New York: Wiley.

CAPITULO DIEZ

CAMINOS METABOLICOS

Hasta hora hemos tratado con enzimas y de la forma como actúan sobre los substratos, ya sea oxidándolos o reduciéndolos, separándolos con agua o con fosfato; o bien, combinando dos moléculas pequeñas para hacer una molécula más grande. Pero, ¿qué son estos substratos? ¿estos compuestos sobre los cuales actúan las enzimas? Principalmente, son el material alimenticio que toman las células, o los productos de la transformación de estas sustancias nutritivas. Por ejemplo, ya sea que lo que penetra a nuestro organismo sea un carbohidrato, grasa, proteína, ácidos nucleicos o algunos otros componentes, son descompuestos en moléculas más pequeñas por medio de las enzimas de la saliva y las del tracto gastrointestinal. Entonces, los productos de la descomposición entran a las diversas células del cuerpo, a través de la corriente sanguínea, y por medio de mecanismos que se detallarán en el Cap. 15. En algunas células, la transformación va más lejos; en otras tiene lugar la síntesis de moléculas más grandes a partir de las más pequeñas; aún más, en otras, la forma predominante de ataque puede dar lugar a diversas transformaciones de estos compuestos. En la mayoría de los casos, las diversas células del cuerpo pueden verificar todas estas funciones. De todas maneras, la forma preponderante para la utilización o metabolismo de estos compuestos en las diversas células de los diferentes órganos, varia de acuerdo con la naturaleza de las mismas. Algunas, como las células del hígado, son muy activas en proporcionar una buena cantidad de proteínas circulantes de la sangre y en movilizar glucosa para uso del resto de las células del cuerpo, principalmente las de los músculos. Otras, como las diversas células secretoras de las diferentes glándulas, son activas en sintetizar y secretar hormonas, las cuales, a través de la sangre, son después depositadas en sus respectivos sitios en los órganos de destino, y posteriormente son activas, en algunos aspectos, para regular el completo metabolismo del cuerpo. En estas tareas y en muchas otras que se bosquejarán en capítulos posteriores, la célula hace trabajo, y al hacerlo necesita gastar energía. En general, la obtiene por medio del metabolismo de una parte de los mismos productos de descomposición que se emplean en la síntesis de los compuestos más grandes de la célula. Así, parte de los productos resultantes de la descomposición, se emplean para sintetizar glucosa o glicógeno, en el hígado y en las células de los músculos, en tanto que otra parte del resto es metabolizado para proveer la energía para estas síntesis.

En el metabolismo de los carbohidratos

De este escueto bosquejo, está claro que muchos de los substratos, o metabolitos, son atacados no precisamente de una sola manera por una sola enzima. En muchos casos, existe más de una enzima atacando al mismo metabolito -una oxidándolo, otra reduciéndolo, y una para agregarle algún otro compuesto.

Así, nosotros podemos hablar de **caminos metabólicos**, es decir, las diferentes direcciones que puede llevar un metabolito. Por ejemplo, la misma sustancia puede ser atacada por una enzima para producir energía química y puede también ser puesta, por otra enzima, en el camino para la síntesis de alguna de las moléculas más grandes de la célula, como proteínas y ácidos nucleicos. Un buen ejemplo de esto es el destino del fosfato-6-glucosa en la célula del hígado (Fig. 10-1).

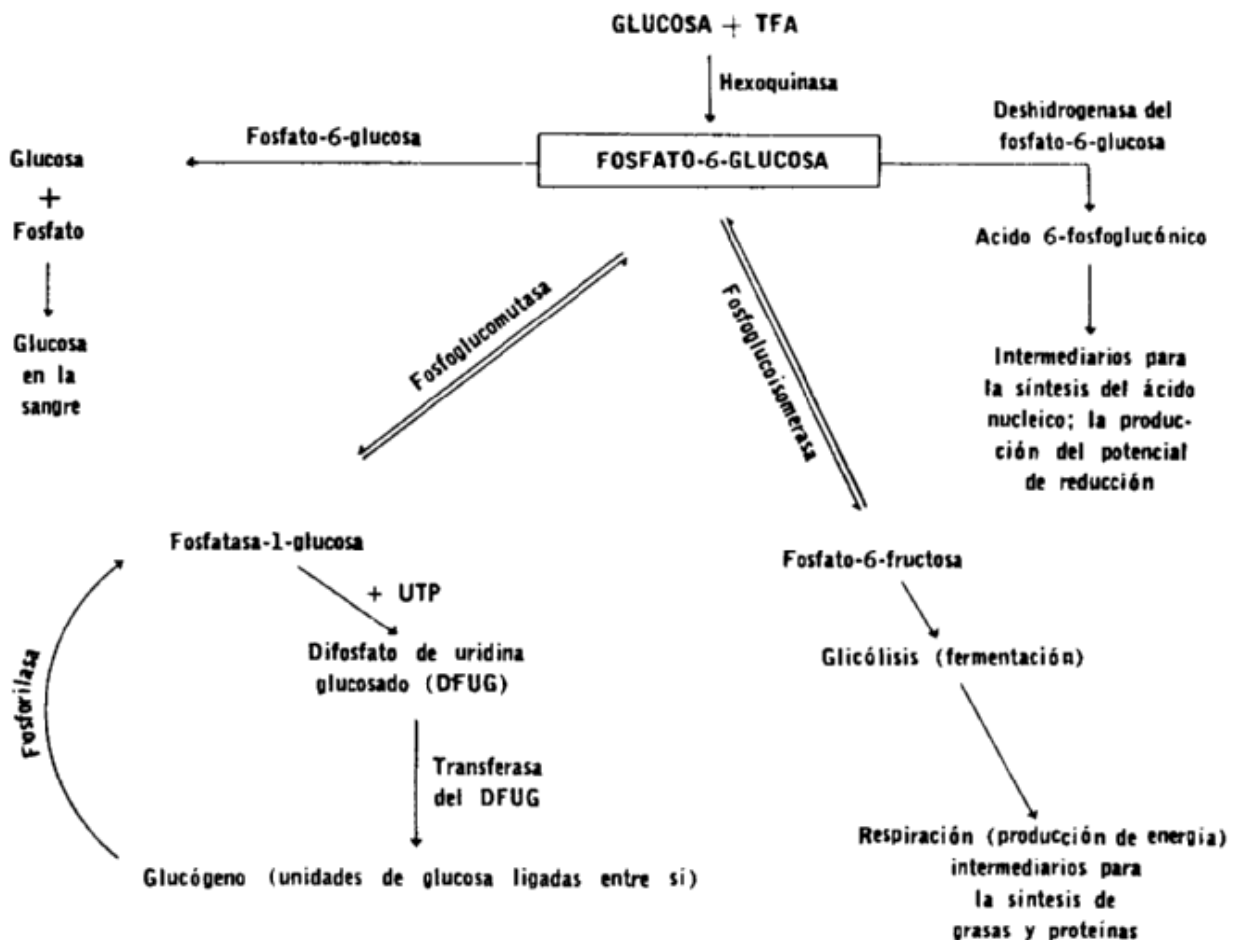


Fig. 10-1. Camino general para la glucosa en la célula del hígado

Esta sustancia se puede formar por diversos medios enzimáticos, ya sea partiendo del glucógeno; o por intermediarios menores de fermentación; o de la glucosa libre (véase

Cap. 14). Una vez que se ha formado, pueden actuar sobre él cuatro enzimas diferentes; es decir, existen cuatro vectores para su metabolismo:

- (1) aportar abastecimiento de glucosa en la sangre,
- (2) fabricar glucógeno hepático para servir de almacén, para la glucosa de las células de la sangre y de los músculos,
- (3) proveer de intermediarios para las síntesis de grasas, proteínas y ácidos nucleicos, y
- (4) proveer de energía.

Exactamente como todo esto es regulado por las células del hígado, no lo sabemos, pero es casi seguro que las velocidades relativas de las reacciones enzimáticas y de las diversas hormonas, tienen que ver en parte en esta regulación, al determinar qué proporción de moléculas de glucosa viaja a lo largo de cada ruta. La naturaleza es conservativa en el sentido de que cada compuesto actúa como un punto de partida para muchos pasos metabólicos diferentes. Hemos sugerido que la razón es debida a que la regulación completa del metabolismo -la fisiología- de la célula, es mucho más fácil, si existen menos puntos clave que deben ser acomodados. En este caso, a la célula le resulta más fácil cambiar de camino. En el ejemplo mencionado anteriormente, el compuesto clave podría ser el fosfato-6-glucosa.

También, aunque el ejemplo es la célula del hígado, otras células tan distantes biológicamente como la célula de la levadura, tienen la mayor parte de las mismas enzimas, los mismos caminos y son, probablemente, propensas al mismo tipo de regulación.

Sin embargo, aun el diagrama simplificado de la Fig. 10-1, no proporciona todos los otros caminos alternativos conocidos en este gran subcampo del metabolismo. Por ejemplo, la síntesis de los ácidos nucleicos es un requisito necesario para el crecimiento de la célula, como veremos en capítulos posteriores. Uno de los componentes de estos compuestos complicados es el azúcar de 5 carbonos, la ribosa. El precursor inmediato de ésta, el fosfato-5-ribosa, se sintetiza por muchos caminos. Del precursor de los carbohidratos, el fosfato-6-glucosa, existen actualmente tres caminos que conducen a la formación de este compuesto (Fig. 10-2). Uno de estos caminos, el del fosfato-pentosa, se ha conocido desde hace mucho tiempo. En realidad, se reconocen ahora dos caminos de fosfato-pentosa, el oxidativo y el no oxidativo. El primero, conduciendo la fosfato-5-ribosa en cuatro etapas enzimáticas, es una fuente primordial de potencial reductor bajo la forma de FDNAH: (véase más adelante); potencial reductor a causa de que esta coenzima, el FDNAH₂, es un reactante concomitante necesario para la síntesis de los ácidos grasos y de los esteroides. El camino no oxidativo de fosfato-pentosa comienza con la conversión del fosfato-6-glucosa a fosfato-6-fructosa. Pero en lugar de continuar en el camino glicolítico (véase la Fig. 14-2), los átomos de carbono del fosfato-6-fructosa van a través de una serie de reacciones de condensación y transferencia, conduciendo por medio de las importantes enzimas, transaldosas y transcetosas, al fosfato-5-xilulosa y al fosfato-5-ribosa. El primer compuesto, también se forma por el camino oxidativo y por otro, llamado camino del ácido urónico, pasando por el difosfato de uridilglucosa y 11 reacciones enzimáticas. Puesto que el fosfato-5-xilulosa puede

convertirse en fosfato-5-ribosa, a través del intermediario fosfato-5-ribulosa, el camino ácido urónico es, también, una fuente de la mitad de ribosa de los ácidos nucleicos.

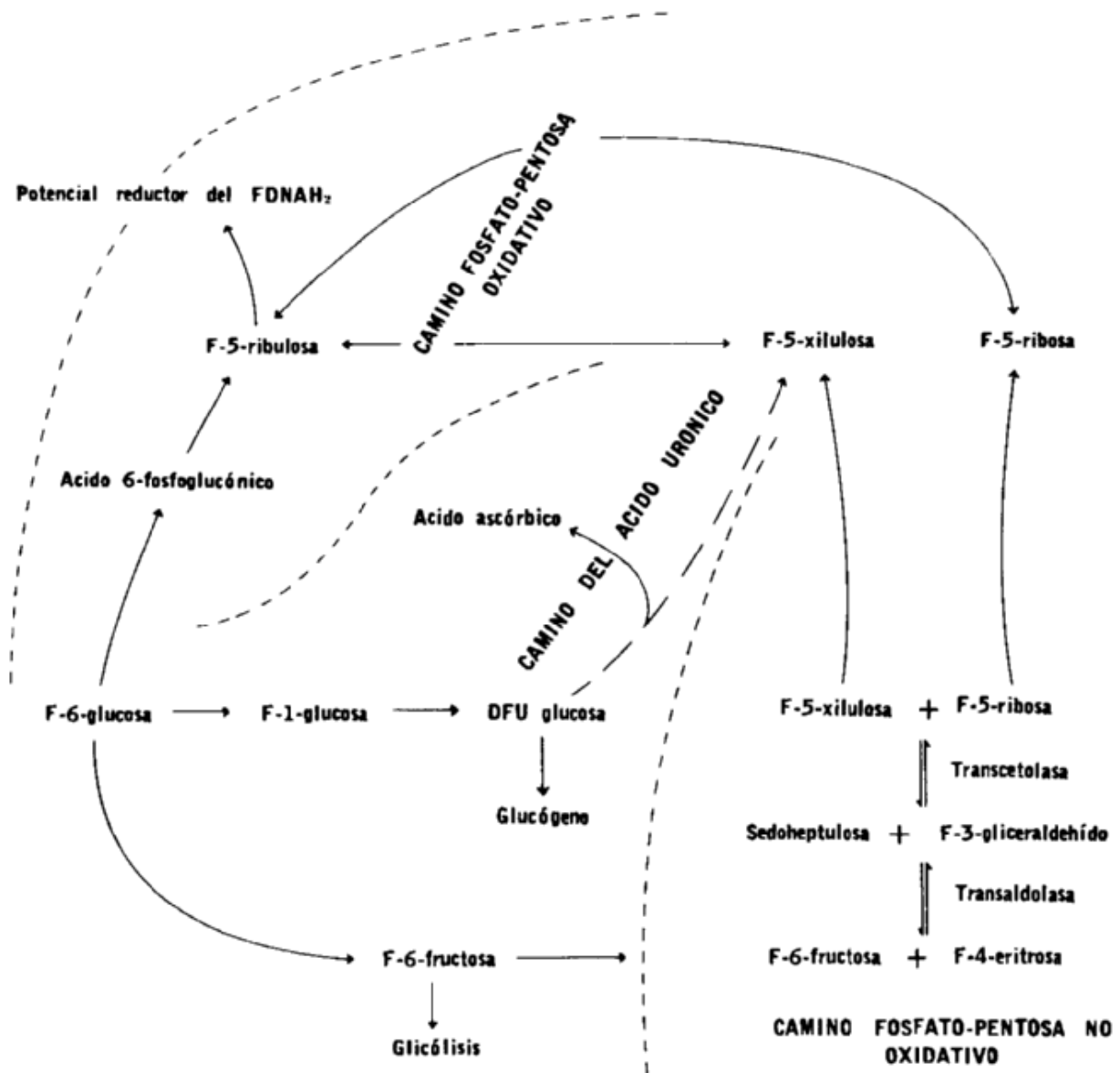


Fig. 10-2. Caminos fosfato-pentosa

Los marcadores de radiactividad indican que todos estos caminos parecen operar en la célula al mismo tiempo, aunque el tráfico en el camino, conduciendo a la ribosa a través de ácidos urónicos, parece ser insignificante comparado con los otros dos. En las células del hígado y de los músculos, al menos, el difosfato de uridin-glucosa formado de esta manera, es llevado para la síntesis del glucógeno. Pero, ¿por qué deben existir estas múltiples fuentes de ribosa? No estamos seguros, pero pensamos que, puesto que la síntesis del ácido nucleico es necesaria para el crecimiento de la célula y aun para su

existencia, la célula se ha proveído, por sí misma, de más de un camino para su síntesis en caso de que los otros sean bloqueados. Esto se puede ilustrar experimentalmente, empleando la observación de que la vitamina tiamina, bajo la forma de pirofosfato de tiamina, es un cofactor necesario en el funcionamiento de las enzimas del camino no oxidativo, transaldolasas y transcetolasas.

Se ha demostrado que en los animales normales, de todos los átomos de carbono de glucosa que se convierten en ribosa, aproximadamente el 40% de los átomos radiactivos de carbono de la glucosa administrada, se convierten en átomos de carbono de ribosa por el camino oxidativo y el 60% por el no oxidativo.

Sin embargo, en animales que son deficientes en tiamina, aproximadamente el 80% de los carbonos de la ribosa fueron formados por el camino oxidativo. Así, la célula parece tener implicados múltiples caminos para asegurar que un compuesto necesario sea formado, no importa en qué condiciones ambientales se pueda encontrar la célula. En el caso anterior, este compuesto es el fosfato-5-ribosa. Otro ejemplo, implicando los mismos caminos alternativos, podría ser la necesidad de la célula para formar suficiente FDNAH: para la síntesis de esteroides y grasas.

El Ciclo de Krebs

Esta disposición de la naturaleza de ser conservadora, se muestra también en el hecho de que casi los mismos caminos existen para la síntesis de grandes moléculas que para la producción de energía. Esto no es completamente cierto durante todo el trayecto del camino, puesto que se sabe actualmente, que existen diferentes porciones del camino para el desdoblamiento y la síntesis de las proteínas, para el desdoblamiento y síntesis de los carbohidratos (véase el Cap. 14) y para el desdoblamiento y síntesis de las grasas. Pero bajando en la escala metabólica, en donde están los intermediarios para todos estos procesos, los caminos metabólicos están dispuestos de tal manera que un cambio en la dirección, por decirlo así, puede conducir, ya sea a la combustión de un intermediario para producir energía o al acoplamiento de un intermediario con otro compuesto para formar moléculas mayores. En este sentido, el bioquímico habla de ciclos, de verdaderas ruedas. Quizás sea más fácil explicar esto, penetrando en los detalles del más famoso y viejo de estos ciclos, el ciclo del ácido tricarboxílico (ATC), o ciclo de Krebs, nombrado así por su formulador. Al hacerlo así, aprenderemos también un poco de cómo un bioquímico trabaja y de cómo estos caminos llegan a ser formulados. Es una historia fascinante.

En la Fig. 10-3 se muestra el ciclo. Esencialmente, es un esquema, en el cual, los dos átomos de carbono del ácido acético son oxidados para dar dióxido de carbono y agua, y, al mismo tiempo, se produce una gran cantidad de energía biológica. Este compuesto de 2 carbonos es, en realidad, la **acetil-coenzima A** y su producción es un resultado del desdoblamiento previo de los alimentos grasos y de los carbohidratos. El carbohidrato, cuando se introduce al cuerpo de un organismo pluricelular, está bajo la forma de

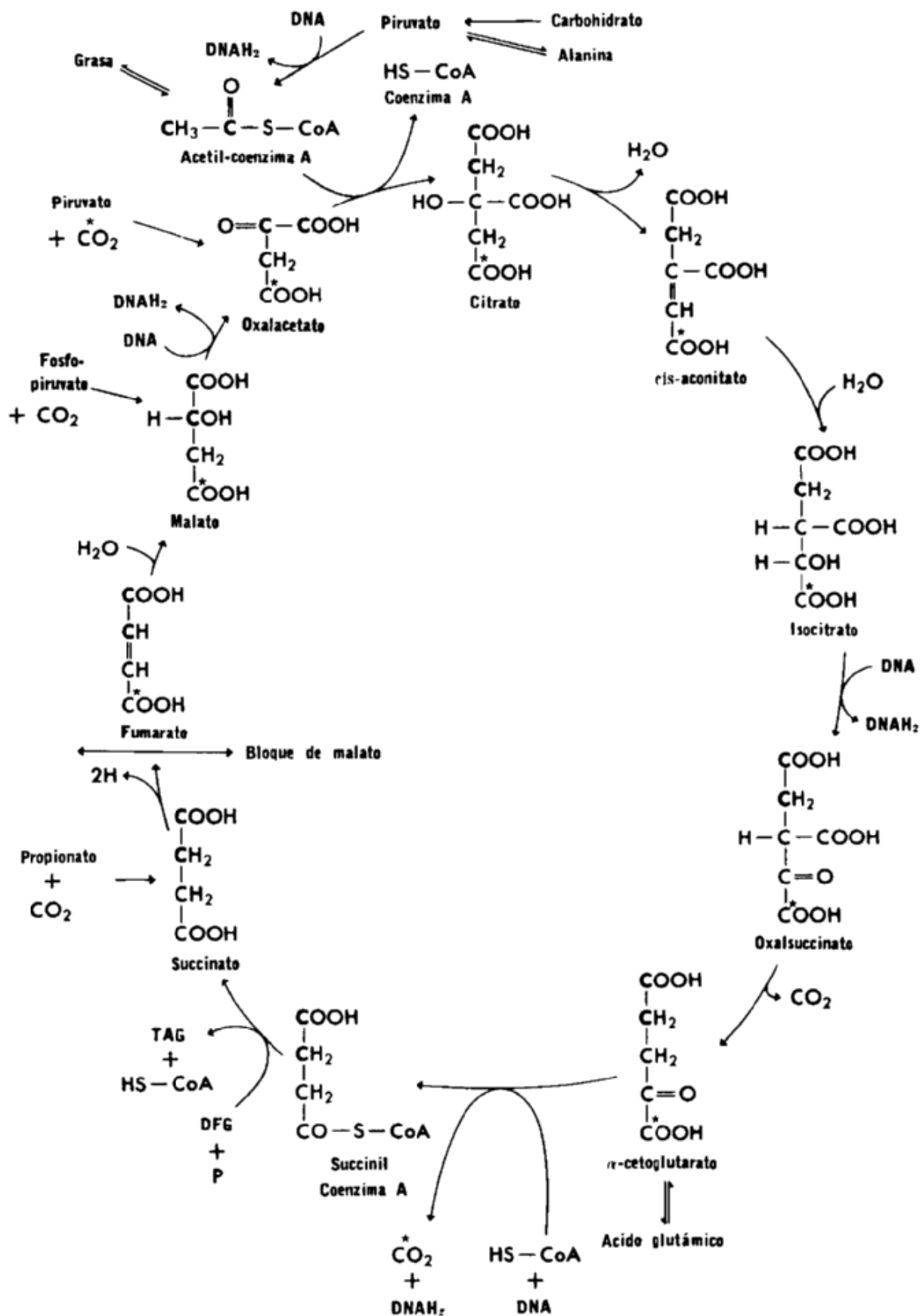


Fig. 10-3. Ciclo del ácido tricarboxílico (Krebs).

grandes polímeros de unidades de glucosa que deben ser primeramente desdoblados en unidades más pequeñas. El desdoblamiento en moléculas de glucosa simples se hace, principalmente, por medio de enzimas extracelulares, que son secretadas por células. Entonces la glucosa penetra dentro de las células del cuerpo por medios que se describirán posteriormente.

En el caso de organismos unicelulares, como las bacterias y algunos hongos, el carbohidrato en el medio ambiente es desdoblado ya sea por medio de enzimas secretadas en el medio por las células, o por enzimas situadas en la superficie de las células. La glucosa, ahora dentro de las células, es desdoblada por una serie de enzimas conocidas colectivamente como enzimas glicolíticas (véase el Cap. 14). El producto final de todo esto es, generalmente, el ácido pirúvico. Este compuesto, a su vez, es oxidado para dar la acetil-coenzima A en una reacción enzimática sumamente complicada. El último compuesto puede oxidarse aún más, a través del ciclo ATC, o puede ir, a través de una serie de reacciones, en las cuales se condensa sucesivamente con sí mismo o con un derivado de sí mismo, para formar los ácidos grasos superiores. Estos ácidos grasos son compuestos de cadena recta, de 14 a 20 carbonos de longitud. Así es como los carbohidratos se convierten en grasa y cómo el azúcar ingerido termina como cuerpo graso.

El porqué en algunos casos la acetil-coenzima A consigue oxidarse para proporcionar energía, y en otras circunstancias se condensa para construir ácidos grasos más largos que proveen de grasas, no lo sabemos, pero existen algunas explicaciones posibles basadas en las circunstancias del ciclo del ATC.

Por ejemplo, obsérvese en la Fig. 10-3 que el primer paso en la oxidación de la acetil-coenzima A es la condensación, con el auxilio de una enzima llamada simplemente "enzima condensadora", de este compuesto, con el oxalacetato para formar el citrato. Ahora, supóngase que hay muy poco oxalacetato disponible para este paso. La condensación se reducir mucho en cantidad, y la acetil-coenzima A no podrá oxidarse más en grandes cantidades; en su lugar, una buena cantidad de ella irá en un camino alterno. Este es el que capacitará a la acetil-coenzima a formar ácido graso de cadena larga. La desviación en este punto es uno de los posibles medios para que un común precursor sea transformado ya sea en carbohidrato o en grasa.

Para regresarse al ciclo, el citrato formado en la reacción anterior es atacado por una enzima, la aconitasa, que origina un equilibrio que debe establecerse entre los tres compuestos, el citrato, el cis-aconitato y el isocitrato. La dirección de la reacción está constantemente desviada hacia la formación del isocitrato, debido a que existe una enzima que ataca a esta sustancia; eliminando al isocitrato de la reacción por medio de la aconitasa, el equilibrio total resulta en la formación de más isocitrato a partir del cis-aconitato y del citrato. Esta clase de hechos, la desviación de un equilibrio enzimático por medio de otro ataque enzimático sobre uno de los compuestos implicados, no es un incidente singular en la célula, sino que prosigue constantemente. De esta manera, muchas reacciones que son termodinámicamente reversibles, en las cuales está implicado muy poco cambio en la energía libre, están constantemente siendo vueltas

irreversibles "enzimáticamente" es decir, encauzadas para ir la mayor parte del camino en una sola dirección. Si se aumenta la concentración del isocitrato, como se puede hacer experimentalmente, resultar la formación de citrato a partir del isocitrato.

La enzima que ataca al isocitrato, llamada deshidrogenasa del isocitrato, emplea al dinucleótido de nicotinamida-adenina (DNA) como una coenzima mientras que una enzima similar, utiliza el fosfato del dinucleótido de nicotinamida-adenina (FDNA). Estas dos coenzimas fueron conocidas anteriormente como el nucleótido de la difosfopiridina (NDF) y como el nucleótido de la trifosfopiridina (NTP). En el proceso, el isocitrato es oxidado a oxalsuccinato, con la pérdida de dos átomos de hidrógeno, dando DNAH2 o DNA reducido (y en el otro caso FDNAH2). La misma enzima, probablemente al mismo tiempo origina una descarboxilación del oxalsuccinato, para dar el α -cetoglutarato y bióxido de carbono. Este proviene de la oxidación de uno de los átomos de carbono del oxalacetato original. La formación del DNAH2 es notable por el hecho de que su oxidación subsecuente conduce a la producción de energía biológica. Como se lleva a cabo el último proceso, se discutir en el próximo capítulo. Baste señalar aquí esta función posterior del ciclo, el originar la producción de la mayor parte de la energía que es empleada por la célula.

El siguiente paso, la descarboxilación oxidativa del α -cetoglutarato para formar el succinato y dióxido de carbono, por medio de la enzima deshidrogenasa del α -cetoglutarato, es también una reacción muy complicada. La coenzima A toma parte otra vez, y lo que en realidad se obtiene no es el succinato, sino la succinilcoenzima A. Esta deshidrogenación tiene lugar de nuevo con la ayuda del DNA para dar lugar al DNAH2 y otra vez este DNAH2 es más oxidado para proporcionar energía. Sin embargo, hay otro paso en esta reacción completa que suministra energía. Esta es la supresión enzimática de la coenzima A de la succinilcoenzima A con ayuda del difosfato de guanosina (DFG) y fosfato inorgánico para formar trifosfato de guanosina (TFG). Este TFG es un compuesto de elevada energía, cuyas propiedades ya se mencionaron. De esta manera, la secuencia completa de las reacciones a partir del α -cetoglutarato para dar succinato, proporciona producción de energía para la formación del DNAH2, y del TFG. Este último puede reaccionar enzimáticamente con el difosfato de adenosina (DFA) para formar DFG y trifosfato de adenosina (TFA). Es este último nucleótido, el TFA, el que ha recibido el nombre de moneda energética del reino biológico. Obsérvese, accidentalmente, que durante la oxidación del α -cetoglutarato, otra molécula de bióxido de carbono se elimina del oxalacetato original.

La siguiente reacción, la deshidrogenación succínica, es una muy poderosa, en la cual dos átomos de hidrógeno son eliminados del succinato para formar el fumarato. En el proceso, los dos átomos de hidrógeno, dejados suspendidos en el esquema, son transferidos al citocromo b, para formar el citocromo reducido b. Este citocromo b es una proteína portadora de electrones que contiene un hem de hierro como grupo prostético: tendremos más que decir acerca de este tipo de compuesto en el siguiente capítulo.

El fumarato que resulta de la reacción anterior, toma entonces una molécula de agua con la ayuda de la enzima fumarasa, para formar el malato. Este es oxidado por la deshidrogenasa málica y por el DNA para formar el DNAH₂ y otra vez el oxalacetato. Siguiendo los dos átomos de carbono (letra más negra) del acetato a través del ciclo, se observa que terminarán en la nueva molécula de oxalacetato. Así, aunque el oxalacetato está de nuevo de regreso, no es precisamente la misma molécula, puesto que ha perdido átomos de carbono bajo la forma de dióxido de carbono y los ha recuperado de nuevo de la acetil-coenzima A. Esta molécula de oxalacetato puede ahora aceptar otra molécula de acetil-coenzima A y el ciclo se repetir. Podemos decir, por lo tanto, que los dos carbonos de las moléculas del bióxido de carbono resultan de la oxidación del acetato.

El ciclo es la clave de la oxidación de las grasas y de los carbohidratos, porque ahora sabemos que la mayor parte de las grasas y una buena parte de los carbohidratos son oxidados por medio del ciclo. Ya que los ácidos, α -cetoglutarico, oxalacético y pirúvico pueden formarse muy fácilmente de los aminoácidos (glutámico, aspártico y alanina), el ciclo es también responsable de la oxidación de algunas de las proteínas intermediarias de la célula. Este punto de vista está robustecido por el hecho de que otros muchos aminoácidos se pueden desdoblar en intermediarios, tales como la acetil-coenzima A, el α -cetoglutarato, el oxalacetato, el succinato o el fumarato. Se puede estimar que la oxidación de los átomos de carbono de la mayor parte de los substratos tomados por la célula, se produce a lo largo de este ciclo. Esto sucede en toda clase de células, desde la mayoría de las diferentes clases de células de nuestro organismo hasta las células de plantas, levaduras y bacterias.

¿Y el reverso de la medalla? El ciclo también está implicado en la síntesis de los intermediarios que conducen a la formación de moléculas mayores. Por ejemplo, por aminación, la colocación de amoníaco en diversas formas, da origen a la formación de aminoácidos a partir de intermediarios del ciclo. A su vez, algunos de los aminoácidos son precursores de las purinas y de las pirimidinas y por lo tanto, de los ácidos nucleicos; también son precursores de las porfirinas. El oxalacetato, condensador inicial en el ciclo, se encuentra también en el camino de la síntesis de la hexosa y de la pentosa, esta última estando implicada como la mitad del azúcar de los ácidos nucleicos.

En las reacciones subordinadas del ciclo, como se muestra en el esquema, el bióxido de carbono puede fijarse en forma orgánica, combinándose con el piruvato para formar el oxalacetato; con el fosfopiruvato para dar el malato y con el propionato para originar el succinato. Estas reacciones hacen entrar al bióxido de carbono, dentro del esquema, para formar sustancia celular.

Este empleo del bióxido de carbono se encuentra, no solamente en la fotosíntesis a través de diferentes reacciones, sino también hasta cierto punto, por medio de las mismas reacciones anteriores, en nuestros propios cuerpos que se "asemejan a plantas".

Aun con esta breve descripción, uno se puede dar cuenta de que el ciclo tiene un papel central en el metabolismo de los materiales alimenticios por medio de las células. A través de él pasan la mayoría de los intermediarios químicos -la mayor parte de los átomos de carbono, para ser más exactos- de los componentes químicos de la célula. Es

el centro de un gran número de caminos implicados en el desdoblamiento y síntesis con los componentes celulares. La razón de esto es que los intermediarios del ciclo, particularmente los de 4 carbonos están muy implicados como intermediarios en otros caminos del metabolismo químico de la célula. Tarde o temprano, los compuestos implicados en los últimos caminos alcanzan alguna parte del ciclo. Cuando esto sucede, sus átomos de carbono pueden ya sea oxidarse para proporcionar energía, o desviarse hacia otro camino.

Aunque la estructura del ciclo se ha establecido muy bien, bastante poco se conoce de la forma como los carbonos son desviados, de cómo el ciclo "sabe" qué camino hacer funcionar, es decir, ya sea como una fuente de energía biológica, como un mecanismo para la síntesis de los componentes que necesita la célula o como un medio por el cual, el metabolismo es cambiado de un camino importante a otro, digamos de los carbohidratos a las grasas. De los estudios fisiológicos, nosotros sabemos que estas desviaciones pueden ocurrir, y que de hecho, ocurren. Los carbonos de los carbohidratos terminan en grasa; los carbohidratos están formados de moléculas más pequeñas y se encuentran almacenados; los carbohidratos se desdoblan para proporcionar energía. La grasa es sintetizada o desdoblada; las proteínas son formadas o desdobladas. Los carbonos de los carbohidratos, grasas y proteínas son todos intercambiables.

Todos estos hechos ocurren en algún momento y como conocemos ahora la mayor parte de los caminos metabólicos a lo largo de los cuales circulan estos intermediarios, comprendemos que el lugar clave donde ocurre la regulación de estos pasos se encuentra en el ciclo de Krebs.

“¿Cuáles son los caminos alternativos posibles? Una mirada al ciclo sugiere varias posibilidades casi inmediatamente y pueden hacerse experimentos con tejidos desmenuzados (homogeneizados) para probar varios de ellos. Por ejemplo, el piruvato se puede oxidar a dióxido de carbono y agua por medio de estos homogeneizados, por medio del ciclo de Krebs; sin embargo, para que esto tenga lugar es necesario añadir una cantidad adecuada de ácidos de 4 carbonos, como el oxalacético, el málico o el fumárico, ya que todos éstos son interconvertibles. Si alguno de estos ácidos se omite de la mezcla reaccionante, el piruvato no se oxida sino que, en su lugar, es convertido por medio de la acetilcoenzima-A en acetoacetato, uno de los productos intermedios del metabolismo de las grasas.

Este resultado muestra que la acetilcoenzima-A no se condensa con el oxalacetato para formar el citrato, sino que se condensa consigo misma para formar el acetoacetato. Se puede añadir también cloruro de amonio, el cual, asimismo, evita bastante la oxidación del piruvato y ocasiona su conversión a acetoacetato.

La razón de esto, probablemente, es que el cloruro de amonio añadido, elimina a los intermediarios del ciclo de Krebs, como el α -acetoglutarato y el oxalacetato, originando que se conviertan en los aminoácidos glutámico y aspártico. Puesto que todos los intermediarios están en equilibrio entre sí, una disminución de algunos de ellos se reflejará en una disminución de todos, y así los niveles de los intermediarios serán demasiado bajos para efectuar una condensación efectiva con la acetilcoenzima-A

derivada del pirúvico. Así, de nuevo, dos de los átomos de carbono del pirúvico terminarán como carbonos de grasa.

Verificación del ciclo

Pero, ¿cómo sabremos que algo como esto está realmente sucediendo dentro de la célula o dentro del animal? No lo sabemos exactamente, pero podemos hacer algunas conjeturas bastante acertadas. Los marcadores radiactivos, como el carbono 14, se pueden incorporar dentro de ciertos compuestos químicos, como el ácido pirúvico, y este ácido, así marcado, darlo entonces a un organismo, ya sea éste una célula de levadura o una rata. Varios compuestos químicos -glucosa, grasas, aminoácidos- se aíslan entonces. Conociendo qué tomo de carbono del ácido pirúvico se marcó y determinando qué átomos de carbono de los compuestos aislados están marcados, se puede inferir bastante bien, conociendo las reacciones bioquímicas individuales implicadas, lo que sucedió en el organismo con los átomos de carbono individuales del ácido pirúvico ingerido. Sobre las bases de muchos experimentos como éste; diversos investigadores han llegado a las conclusiones ineludibles de que el ciclo de Krebs es operativo en la célula como también en los tubos de ensayo; que existen caminos metabólicos alternativos para muchos de los intermediarios del metabolismo de las grasas, de los carbohidratos y de los aminoácidos; y que estos intermediarios se cruzan entre si al nivel del ciclo de Krebs. Las reacciones del ciclo de Krebs pueden explicar completamente las formas por medio de las cuales los átomos de carbono del piruvato terminan en varios otros compuestos. En la ciencia, la verificación de esta predicción se considera como la prueba de la "veracidad" de la teoría.

Esto nos conduce a la evidencia original del ciclo y a los cimientos sobre los cuales Krebs formuló el esquema. En tejidos desmenuzados, como músculos del pecho o hígado, se observó hace mucho tiempo, que la adición de cantidades muy pequeñas de citrato catalizaban una intensa respiración. Se encontró también que el citrato podía sintetizarse cuando se añadía oxalacetato y que el citrato, el isocitrato, el cis-aconitato y el α -cetoglutarato eran todos rápidamente oxidados por estos tejidos desmenuzados. Pero el hallazgo de los primeros trabajos de laboratorio implicaba el empleo de un inhibidor enzimático particular, el ácido malónico, que específicamente inhibe la enzima deshidrogenasa y evita el intercambio de hidrógenos entre el succinato y el fumarato. Sin embargo, se ha visto que aun en presencia de malonato, el succinato podía, en realidad sintetizarse, cuando se añadía fumarato u oxalacetato. Observando el ciclo, podemos ver que el succinato no se pudo formar por la reducción directa del fumarato porque esta enzima estaba bloqueada por el malonato. Krebs dedujo que debía haber una reacción "regresiva" por medio de la cual, el succinato podía formarse vía el desdoblamiento del α -cetoglutarato. Así, se postuló un ciclo empleando los ácidos tricarboxílico, el citrato, el isocitrato y el cis-aconitato y los ácidos dicarboxílicos, succinato, fumarato, malato y oxalacetato. Además, en las células del hígado, en las cuales puede tener lugar la fijación del bióxido de carbono (por medio de la reacción del

piruvato más bióxido de carbono para dar oxalacetato), el citrato y el α -cetoglutarato se pueden formar a partir del piruvato.

La siguiente evidencia, involucraba el uso de bióxido de carbono radiactivo. Cuando este compuesto se incubó con hígado desmenuzado en presencia de piruvato y malonato, se encontró que el succinato aislado no contenía radiactividad y que ésta en el α -cetoglutarato aislado estaba en el carbono del carboxilo próximo al grupo carbonilo. En la Fig. 10-3, el bióxido de carbono radiactivo está marcado con un asterisco; obsérvese que la marca radiactiva se encuentra en el oxalacetato. A causa del bloqueo formado por el malonato, el ciclo tiene que ir en la dirección de las "manecillas de un reloj" y así, la marca se encuentra en el citrato, cis-aconitato, isocitrato, oxalsuccinato y α -cetoglutarato; sin embargo, no se encuentra en el succinato debido a que el grupo carboxilo marcado del α -cetoglutarato se eliminó por la deshidrogenasa del α -cetoglutarato. Si usted observa detenidamente el ciclo, podrá preguntarse si la radiactividad que se encontró en el fumarato y en el malato, proviene del oxalacetato radiactivo. Puesto que no había radiactividad presente en el succinato, es evidente que el succinato no proviene del fumarato, pero debe haberse formado vía una reacción regresiva. Cuando se omite al malonato, todos los ácidos dicarboxílicos, incluyendo al succinato, contienen radiactividad, mostrando la interconvertibilidad de los compuestos en cuestión. También debido a que el malonato específicamente bloquea a la oxidación del succinato, se puede emplear como un sistema de prueba para cualquier compuesto que forme succinato en presencia del inhibidor, puesto que el succinato realmente se acumula bajo estas condiciones y puede ser extraído y calculada su cantidad. Se encontró que todos los intermediarios del ciclo de Krebs, como se postuló, pueden formar succinato bajo estas condiciones.

Estas piezas de evidencia pueden explicarse solamente por medio de las reacciones del ciclo. Podemos proseguir; por ejemplo, se encontró que el citrato puede formarse a partir del acetoacetato y del oxalacetato. Otra vez, cuando el acetato radiactivo o el acetoacetato se añade a riñones desmenuzados se forma α -cetoglutarato radiactivo, y cuando se inyecta al animal con acetato radiactivo, se forman ácidos aspártico y glutámico radiactivos. Puesto que los dos últimos aminoácidos están en equilibrio con el α -cetoglutarato y con el oxalacetato, estamos seguros de que el ciclo funciona en todo el animal. Gran parte de esta evidencia se ha acumulado, tanto de los experimentos en tubo de ensayo como los efectuados en el animal entero. La conclusión ineludible es que existe, en verdad, una cosa como el ciclo de Krebs en las múltiples células del cuerpo de los mamíferos, como también en la mayoría de las células de los organismos de los reinos vegetal y animal. Quizás la evidencia más significativa haya sido el aislamiento y la purificación de todas las enzimas involucradas en el ciclo, indicando que existen enzimas específicas que catalizan estas reacciones igualmente específicas. Que el ciclo es importante para la economía de la célula, queda ilustrado por el hallazgo de que la ingestión de fluoroacetato puede matar a un animal; este veneno detiene el ciclo debido a la inhibición de la enzima aconitasa, acumulando concomitantemente fluorocitrato en la célula.

El ciclo de Krebs, por lo tanto, es una relación metabólica compleja entre muchos de los intermediarios de las grandes clases de material alimenticio ingerido por los organismos. Es un medio, por el cual, todos estos intermediarios pueden ser, de alguna manera, intercambiados; por ejemplo, la energía en los carbohidratos puede almacenarse, para un futuro uso, bajo la forma de grasa y las proteínas almacenadas en el cuerpo, principalmente en los músculos, pueden transformarse en grasas y carbohidratos y convertirse en energía. El ciclo tiene otra función igualmente importante, a saber, la transformación de la energía química en la energía que necesita la célula para efectuar sus diversas funciones; este es el tema del Cap. 11.

El Ciclo del Glioxalato

El ciclo de Krebs es solamente uno de lo que llamamos caminos intersecciones del metabolismo. Es el compuesto químico raro que se metaboliza solamente a lo largo de una secuencia metabólica sencilla. Aun el ciclo de Krebs mismo, es sólo un eje central de caminos entrelazados.

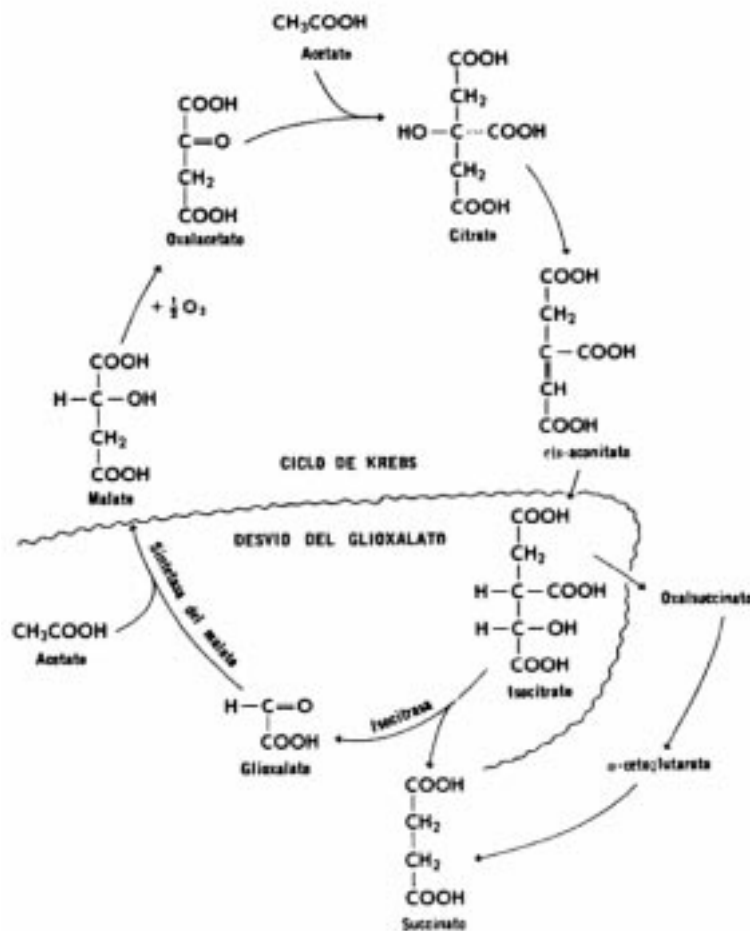


Fig. 10-4. Interacción entre el ciclo de Krebs y el desvío del glioxalato

Por ejemplo, se ha observado desde hace mucho tiempo, que el crecimiento de muchas bacterias y hongos se puede sostener por medio de la adición al medio de compuestos simples de dos carbonos, como el acetato. Este compuesto en estos organismos, a diferencia del caso en los mamíferos, puede dar lugar a un aumento neto en carbohidratos y proteínas vía el ciclo del glioxalato (Fig. 10-4).

Se puede ver que el ciclo intersecta al ciclo de Krebs en los niveles del ácido málico y del ácido isocítrico. **Las bacterias y los hongos tienen, en este punto, dos enzimas que no se encuentran en los animales: la isocitrata, que desdobla al isocitrato en glioxalato y succinato; y la sintetasa de malato, que condensa al glioxalato con otra molécula de acetato para formar malato.** Así, dos moles de acetato se convierten en un mol de succinato. Este puede entrar, por supuesto, en el ciclo de Krebs y, por lo tanto, llegar a ser una fuente de átomos de carbono, de carbohidratos y proteínas.

De manera que la diferencia entre el ciclo de Krebs y lo que pudiéramos llamar, su ciclo de paso de glioxalato es que los carbonos del acetato son oxidados por el primero mientras que se convierten en oxalacetato y, por lo tanto, a carbohidratos y proteínas por el último.

Es interesante especular acerca de los mecanismos de control que determinan si actúa la isocitrata o la deshidrogenasa iso-cítrica; este es el punto clave, la intersección entre estos dos ciclos. En la actualidad, solamente estamos especulando; no tenemos respuestas.

Estudio de un caso

Finalmente, el caso del metabolismo de la metionina (Fig. 10-5) ilustrar, una vez más, los papeles múltiples que una molécula puede representar. La metionina es un aminoácido componente de proteínas. A causa de su grupo metilo lábil (CH_3), actúa como un agente de metilación; puede metilar o transferir sus grupos metilo a aceptores de metilo para formar compuestos tales como la colina y la creatina. El primero es importante porque es un componente de los fosfolípidos que forman las membranas interna y externa de la célula (véase Cap. 15), y es también un factor clave en el metabolismo de los lípidos. La creatina, en la forma de fosfocreatina, es una fuente de energía en los músculos (Cap. 14). Estas propiedades de la metionina pueden demostrarse inyectando etionina a un animal. Se verifican diversos desórdenes fisiológicos, particularmente en el hígado y en el páncreas; tienen lugar desarreglos en el metabolismo de las proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos. La etionina es un antagonista metabólico de la metionina; difiere de ésta solamente en que tiene un grupo $-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_3$ en lugar de un grupo $-\text{S}-\text{CH}_3$ y así puede reemplazar a la metionina en muchas reacciones metabólicas. Reacciona como metionina en cuanto a que llega a unirse a otros aminoácidos por medio de enlaces péptidos y se incorpora a las proteínas; algunas de estas proteínas, debido a este reemplazo, se convierten en poco satisfactorias para desempeñar sus papeles metabólicos. La etionina también compite con la metionina en varias reacciones enzimáticas que requieren metionina. Esta es "activada" para transferir el grupo metilo, reaccionando con el TFA, el compuesto de elevada energía,

para formar el compuesto de metionina "activo", el S-adenosil-metionina. Asimismo, la etionina es atacada por la misma enzima para convertirse en el S-adenosil-etionina. Sin embargo, este último compuesto no es, como el S-adenosil-metionina, un sustrato para las diversas enzimas transferidoras de grupos metilo y es, por lo tanto, una terminal muerta. Si suficiente etionina penetra a una célula que contenga la enzima activadora de metionina puede sacar al TFA de la célula para llevarlo a su *cul-de-sac*; en consecuencia, tanto el metabolismo del ácido nucleico como el metabolismo de la energía, se interfieren.

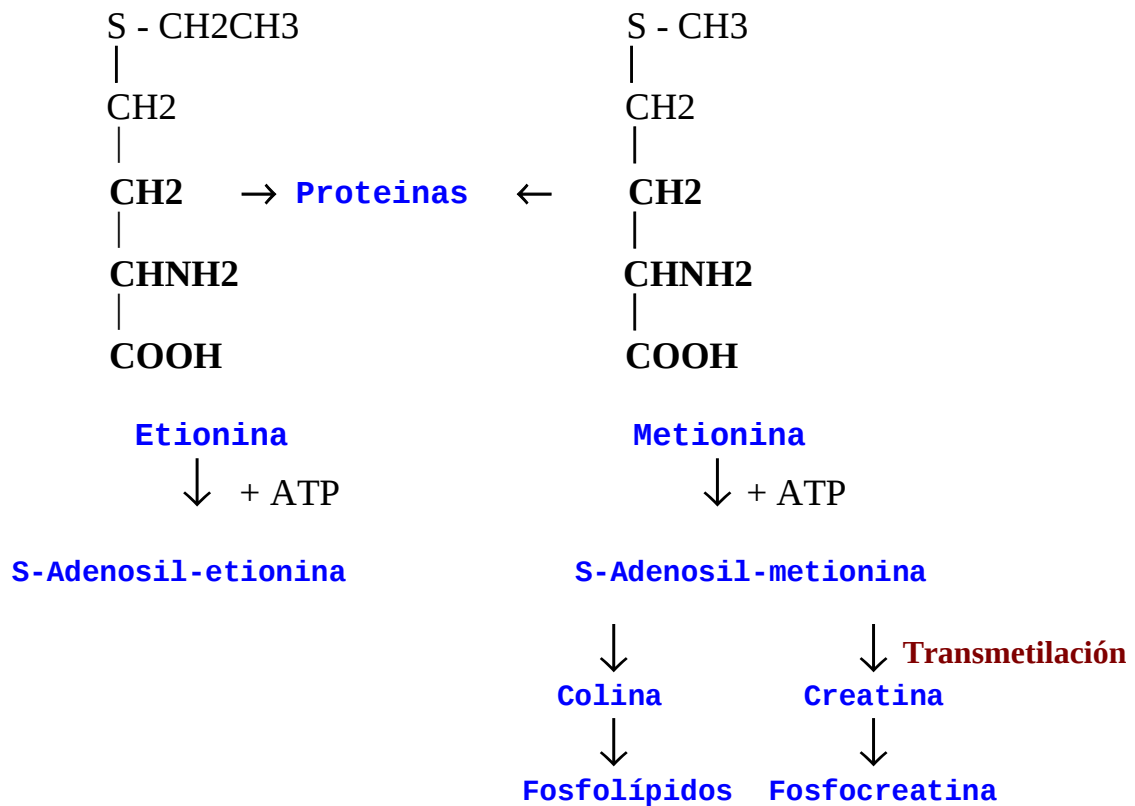


Fig. 10-5. Etionina, un antagonista metabólico

Todos estos hechos múltiples tienen lugar cuando una célula ingiere este sencillo y único antagonista metabólico. Esta observación es un final adecuado para descripción de los esquemas metabólicos de una célula, en los cuales un compuesto desempeña no una, sino muchas funciones. La célula es conservativa, guarda su sustancia y acumula su energía.

Conocemos ahora la existencia de muchas enzimas, de muchos caminos enzimáticos, que involucran a las pequeñas moléculas de la célula. Se han publicado hasta "mapas metabólicos" en forma de libros, enumerando las acciones y las interacciones entre los sustratos y las enzimas a lo largo de estos caminos, implicando no solamente a los carbohidratos, sino también a las proteínas, a las grasas y a los precursores de los ácidos

nucleicos. Aunque estos mapas no han sido una tarea fácil, sino que han necesitado años de trabajo de parte de cientos de individuos, son aún mucho más sencillos que la formidable tarea que queda todavía por delante: la comprensión de las regulaciones a través de estos caminos, de los medios por los cuales una célula determina qué caminos se deben escoger, con el fin de que los destinos finales tengan algún beneficio para la economía de la célula como un todo. No debemos olvidar que la célula es una entidad metabólica integrada, no meramente un conjunto de reacciones enzimáticas separadas espacial y temporalmente. En el Cap. 16, se bosquejan algunas ideas que se poseen acerca de la naturaleza de los mecanismos del control metabólico.

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

AXELROD, BERNARD, "Glycolysis." In Greenberg, D. M. (ed.), 1960. *Metabolic pathways*. New York: Academic Press. Vol. 1, p. 97.

GREEN, DAVID E., "The synthesis of fat" *Scientific American*, February 1960.

----, "The metabolism of fats," *Scientific American*, January 1954.

----, "Enzymes in teams," *Scientific American*, September 1949.

GREENBERG, D. M. (ed.), 1960. *Metabolic pathways*. New York: Academic Press. Vols. 1 and 2, chapters on fat and amino acid metabolism.

KREBS, HANS, A., and LOWENSTEIN, JOHN M., "The tricarboxylic acid cycle."

In Greenberg, D. M. (ed.), 1960. *Metabolic pathways*. New York: Academic Press. Vol. 1, p. 129.

MCELROY, W. D., 1961. *Cellular physiology and biochemistry*. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall.

POTTER, VAN R., and HEIDELBERGER, CHARLES, "Alternative metabolic pathways," *Physiological Reviews*, Vol. 30 (1950), p. 505.

WOOD, HARLAN. G., "Significance of alternate pathways in metabolism of glucose," *Physiological Reviews*, Vol. 35 (1955), p. 841.

CAPITULO ONCE

EL MITOCONDRIO Y LA FIJACION DE LA ENERGÍA

Las células son convertidores de energía; tiene que serlo así necesariamente, debido a que necesitan energía para llevar a cabo sus numerosas tareas. Para sobrevivir y dividirse, para atraer a su interior substratos del medio ambiente, para moverse, contraerse y expandirse -todas las actividades de diversas células, sea trabajo mecánico, trabajo osmótico o la concentración de diversos solutos, requieren energía. Finalmente, la síntesis de compuestos con el fin de fabricar nuevas células, requiere trabajo. La importancia de los mitocondrios reside precisamente en el hecho de que ellos abastecen, prácticamente, toda la energía biológica necesaria, y lo hacen, principalmente, oxidando los substratos del ciclo de Krebs.

Una célula obtiene su energía de la oxidación enzimática de compuestos químicos; en este capítulo describiremos lo que se sabe acerca de este proceso.

LOS MITOCONDRIOS: HISTORIA Y DESCRIPCION

En la década de los veintes, Warburg, un innovador en la bioquímica, encontró que las reacciones oxidativas que tienen lugar en la mayor parte de los tejidos estaban concentradas en una pequeña porción de las células. Moliendo el tejido, hizo lo que llamamos ahora, un homogeneizado del tejido; lo hacemos en la actualidad con un triturador que encaja ajustadamente dentro de un tubo de vidrio en el cual se ha colocado el tejido y un medio adecuado. El homogeneizado se puede centrifugar, y si se hace esto a diferentes velocidades, se obtendrá una separación fraccionada de los componentes de la célula. Cuando Warburg hizo esto, encontró que la mayor parte de las enzimas responsables de la oxidación de los ácidos, que sabemos ahora son intermediarios en el ciclo de Krebs, estaban contenidas en una fracción de gránulo grande, llamada así porque se podría centrifugar a bajas velocidades. Como muchas otras observaciones, ésta quedó perdida en la mente bioquímica colectiva por muchos años, aunque muchos bioquímicos hicieron uso de la técnica de Warburg para determinar algunas propiedades de estas enzimas. Pero nadie le dio mucha importancia a lo que estaba en esta fracción de gránulo grande ni a qué parte de la célula contenía todas estas enzimas. Hace aproximadamente 15 años, sin embargo, varios bioquímicos se interesaron precisamente en este problema y guiados por hombres como Claude, Schneider y Hogeboom, Lehninger y Green, repitieron en esencia los experimentos de Warburg, pero con técnicas, mucho más refinadas,

debido a la acumulación de experiencia bioquímica. Ya que ellos estaban interesados también en citología, descubrieron la importancia bioquímica de los mitocondrios.

Los citólogos habían conocido algo de la existencia de los mitocondrios desde hacía mucho tiempo. Habían visto estos pequeños cuerpos microscópicos en la mayoría de las células del cuerpo; habían podido teñirlos con ciertos colorantes vitales; y sabían que los mitocondrios contenían enzimas que podían reaccionar con estos colorantes. Después de doce años de trabajo con estos mitocondrios, los bioquímicos, actualmente, conocen bastante acerca de ellos; son los componentes importantes de las fracciones de gránulo grande de Warburg, todas las enzimas del ciclo de Krebs se encuentran en estos cuerpos y son, por lo tanto, los responsables de casi toda la transformación de la energía de la célula.

“¿Qué es el mitocondrio? Es una estructura rodeada por una membrana limitante, que se encuentra en todas las células excepto en las bacterias y en los glóbulos rojos maduros de la sangre de los organismos pluricelulares; se halla, también, en células vegetales, en las algas y en los protozoos. En todas estas células su apariencia es muy similar: una membrana exterior limita a la estructura, en tanto que en el interior, existe otra membrana con pliegues o invaginaciones, llamadas crestas, que llegan muy dentro del mitocondrio, algunas veces tan lejos que alcanzan el otro lado. Esta típica estructura se encuentra siempre en las células, de manera que es fácil reconocer a un mitocondrio sencillo por su morfología. La Fig. 11-1 muestra mitocondrios procedentes de hígado de rata, de un riñón de rata y de un alga, la *Chlamydomonas*, tal como se observan en un microscopio electrónico. La Fig. 11-2 es un diagrama derivado de estas micrografías electrónicas.

Enzimas en los mitocondrios

Aún aislados, los mitocondrios conservan su típica apariencia, aunque el proceso de su aislamiento, modifica su textura, daña sus membranas y hace su contorno menos preciso. Estas partículas, en la actualidad, se separan por el mismo método empleado por Warburg; es decir, primero, homogeneizando el tejido en algún medio; **las soluciones de sacarosa isotónicas o hipertónicas son las más comúnmente empleadas.** Por medio de un proceso llamado centrifugación diferencial, el núcleo y las células que no han sufrido ruptura van al fondo durante la centrifugación, y lo que sobrenada se hace sedimentar por medio de una fuerza centrífuga mayor. Los mitocondrios van al fondo bajo la forma de una píldora de color canela. Lavando esta píldora varias veces, se puede obtener una fracción mitocondrial casi pura; y se han obtenido de muchas clases de células animales y vegetales, y hasta de algunos protozoos. La investigación ha demostrado que los mitocondrios procedentes de todas estas fuentes, tienen casi las mismas actividades enzimáticas. En algunos casos, parece ser que son las únicas depositarias de ciertas enzimas en las células. La Tabla 11-1 muestra los resultados de un experimento típico, en el cual, un homogeneizado de hígado fue separado en varias fracciones subcelulares por medio de la centrifugación diferencial. Del total de las actividades **succinoxidasa y citocromoxidasa** en la célula del hígado, un 60% en un caso y un 80% en el otro parece que reside en los mitocondrios. Se cree que la presencia de estas enzimas en las otras fracciones celulares, se debe a la contaminación con mitocondrios rotos o

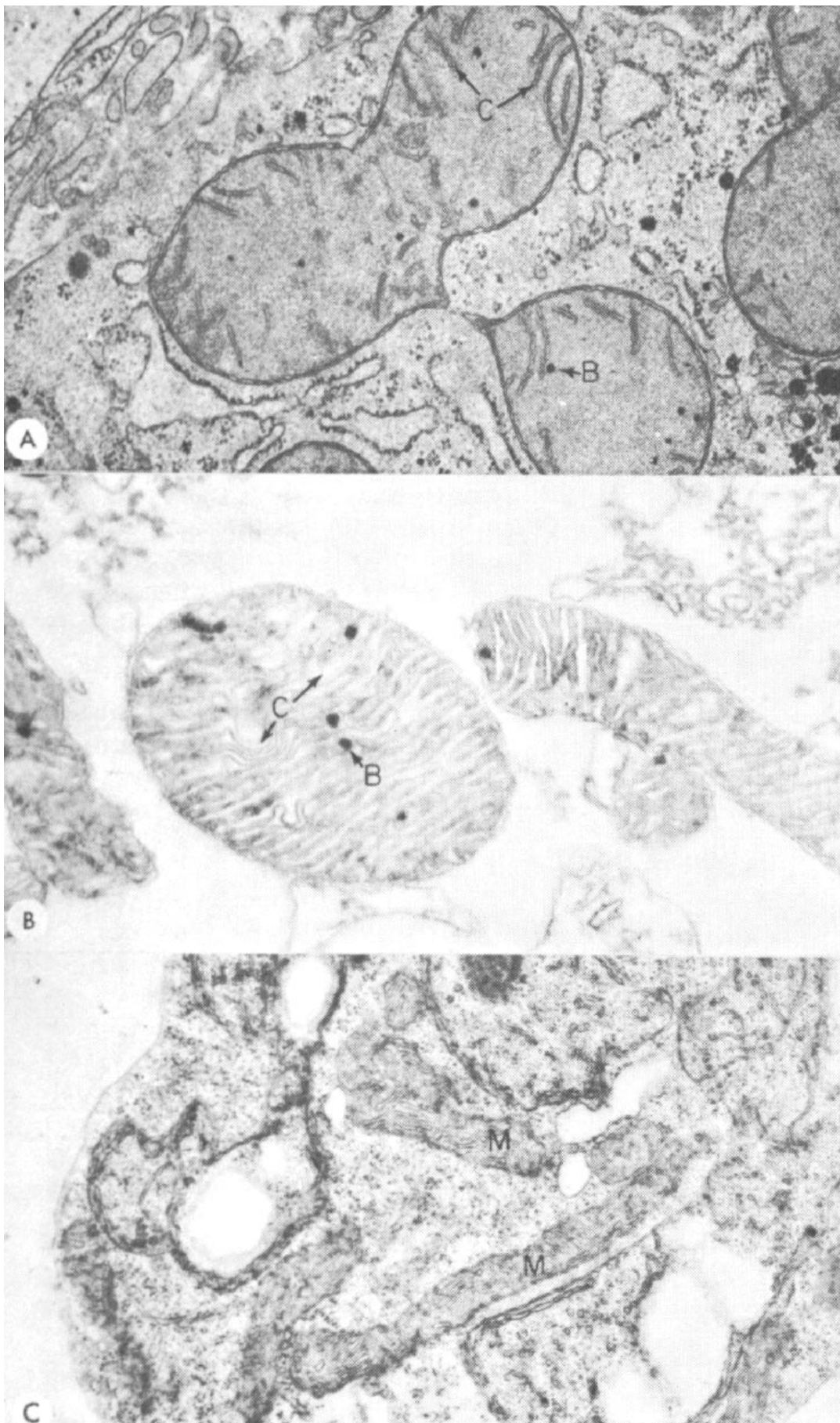


Fig. 11-1 A: Mitocondrios en una célula de hígado de rata (x 50000) B: Cuerpos intramitocóndrios C: mitocondrios en un alga *Chlamydomonas* (x 25000). Cortesía de G. Palade, Rockefeller Institute).

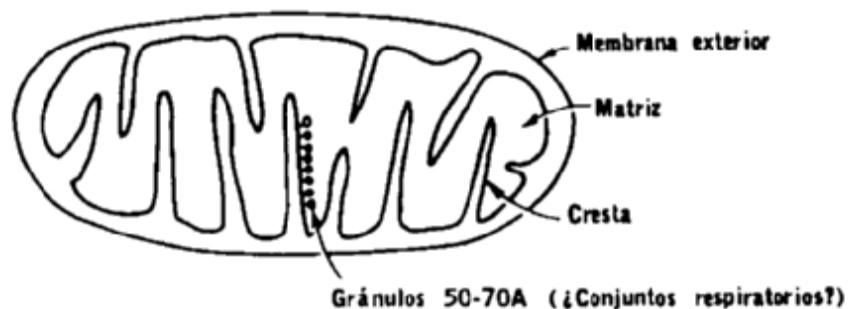


Fig. 11-2 Diagrama de un mitocondrio típico, como se observa en una micrografía electrónica.

TABLA 11-1 DISTRIBUCION DE LAS ACTIVIDADES SUCCINOXIDASA Y CITOCROMOXIDASA EN EL HIGADO DE RATA (SEGÚN HOGEBOM Y SCHNEIDER)

Fracción	Succinoxidasa		Citocromoxidasa	
	Actividad	Act./mg Proteína	Actividad	Act./mg Proteína
Homogeneizado	4.25	1.34	6.86	2.06
Núcleos, desechos de células	0.84	1.65	1.36	2.44
Mitocondrios	2.40	3.18	5.39	6.46
sobrenadante de los mitocondrios	0.18	0.09		
Partículas pequeñas			0.29	0.35
Sobrenadante final			0.00	0.00
Mitocondrios más sobrenadante	3.15			
Mitocondrios, más núcleos, más desechos de núcleo, más sobrenadante de los mitocondrios.	4.18			

enteros. El hecho de que ambas enzimas se hallen concentradas en los mitocondrios, se demuestra por medio de la observación de que, no solamente veces existe un cofactor para la actividad enzimática en alguna otra fracción de la célula, como en la fracción que sobrenada; así, aunque en ésta se halla poca o ninguna actividad enzimática, existe algo allí que, cuando se añade a los mitocondrios, aumenta su actividad succinoxidasa. Experimentos como éstos, en los cuales se han observado efectos de recuperación, activación y recombinación, nos han permitido determinar el sitio de muchas enzimas y de muchos cofactores en la célula. Precisamente de esta manera, se encontró que muchas de las enzimas del ciclo de Krebs estaban localizadas en los mitocondrios.

Este descubrimiento, por supuesto, pedía haberse deducido de la primera observación que se hizo de que los mitocondrios eran capaces de oxidar completamente al piruvato, dando dióxido de carbono y agua. Puesto que sabemos que esto sólo puede suceder a través del ciclo de Krebs, **podemos decir que todas las enzimas del ciclo deben residir en los mitocondrios.** En el caso de algunas de estas enzimas individuales, existe también una gran parte de la actividad celular total que es extra

mitocondrial. "¿Qué están haciendo estas enzimas -por ejemplo, la deshidrogenasa málica- fuera de los mitocondrios? No se sabe con precisión. Como todos los científicos, los bioquímicos se sienten complacidos al permitir que casos difíciles se queden a un lado por algún tiempo, hasta que alguna teoría les llegue a las manos. Por el momento, podemos decir que **el ciclo de Krebs es mitocondrial**, y a causa de que es un ciclo de trasmutación de energía, podemos llamar a los mitocondrios, los transformadores de energía de la célula -los agentes por medio de los cuales la energía innata en los compuestos químicos es modulada en energía biológica que es útil al organismo.

LOS MITOCONDRIOS COMO CONVERTIDORES DE ENERGÍA

El problema de la energía biológica está íntimamente relacionado con el **metabolismo de los fosfatos inorgánicos**. Por el año de 1907, el bioquímico Harden encontró que los fosfatos inorgánicos desaparecían durante la fermentación efectuada con jugo de levaduras libre de células, más tarde encontró que las enzimas en las levaduras esterifican estos fosfatos a formas orgánicas, tales como mono y difosfatos de hexosa, a los cuales aisló posteriormente de las células de levaduras. Durante el periodo de 1930 a 1938, se vio que los fosfatos inorgánicos también desaparecían durante la oxidación aerobia de los carbohidratos, para convertirse también en la forma éster, la cual, en este caso, era el ácido 1,3-difosfoglicérico (véase Fig. 14-2). Sabemos ahora que estos pasos enzimáticos son etapas del esquema glucolítico, en el cual, el glucógeno se desdobla anaeróbicamente en lactato y durante el mismo, también, se pone en libertad algo de energía. Pero no se observó la dependencia de la respiración con la fosforilación, hasta que lo hicieron Engelhardt en 1930 y Kalckar en 1937.

Fue en 1939 cuando se hizo el verdadero intento para determinar el papel de los fosfatos en la oxidación de lo que nosotros llamamos ahora substratos del ciclo de Krebs. Muchos laboratorios, casi simultáneamente, observaron que los fosfatos inorgánicos eran necesarios para la oxidación celular del citrato, glutamato, fumarato, malonato y piruvato; que sin adición de fosfatos al tubo de ensayo, tenía lugar muy poca oxidación. Por lo tanto, la desaparición del fosfato y la oxidación del substrato, se acoplaban mutuamente. Se encontró que, en el tejido muscular, el fosfato que desaparecía era esterificado en creatina; y en el riñón, hígado y los músculos otra vez, era esterificado de nuevo en glucosa, fructosa o ácido adenílico. Podía medirse la cantidad de fosfato que desaparecía, y se encontró que mucho más se eliminaba que el que era capaz de obtenerse por la bien conocida etapa, de entonces, de la fosforilación glucolítica -es decir, la oxidación del fosfato-3-gliceraldehído en ácido 1,3-difosfoglicérico (véase Cap. 14). Por consiguiente, se propuso que el resto de las fosforilaciones tenían lugar durante la transferencia de los electrones del substrato al oxígeno, siendo los substratos, los familiares del ciclo de Krebs. El objeto de la investigación, en aquellos días, era encontrar cómo muchas moles de fosfato inorgánico eran tomadas, bajo la forma orgánica, por el átomo de oxígeno consumido durante la oxidación del substrato. Esta relación es una medida de la eficiencia en la producción de energía, o cuánto substrato se debe oxidar para dar tal energía. Esta relación también proporciona una idea del número de etapas enzimáticas individuales

implicadas. Posteriormente, cuando el ciclo de Krebs fue estudiado completamente, llegó a ser muy claro el hecho de que la mayoría de las fosforilaciones asociadas con la oxidación del sustrato, no tenían lugar directamente con éste sino durante el flujo subsecuente de electrones hasta el último de ellos, o aceptor de hidrógeno, o sea el oxígeno. Por ejemplo, de la Fig. 10-3 se puede concluir que durante la oxidación del α -cetoglutarato a succinato, un fosfato inorgánico se esterifica para formar el trifosfato de guanosina. Pero, cuando el α -cetoglutarato es oxidado completamente por una preparación de tejido, no es una sino hasta cuatro moles de fosfato que son los esterificados por cada átomo de oxígeno consumido, o para cada mol de α -cetoglutarato oxidado. Así, más de tres esterificaciones de fosfato se deben llevar a cabo.

La cadena transportadora de electrones

La cadena transportadora de electrones es el camino biológico más corto para describir una reacción, en la cual, un donador transfiere, con la ayuda de una enzima, un par de electrones a un aceptor. Por ejemplo, el piruvato es oxidado por una enzima que transfiere un par de electrones del piruvato a un aceptor de electrones, siendo éste la coenzima DNA, para formar el DNA reducido, o sea el DNAH₂. Los electrones son entonces transferidos a través de una serie de oxidaciones y reducciones acopladas, al aceptor de hidrógeno final o de electrones, el oxígeno, para formar agua. Estos pares que transfieren electrones se han conocido desde hace mucho tiempo. El más conocido, el citocromo c, es un pigmento demostrado en bioquímica. Pero ahora sabemos que el citocromo c es solamente uno de una serie de pigmentos respiratorios. La Fig. 11-3 ilustra el concepto común de la naturaleza del transporte del electrón, de los sustratos oxidables al oxígeno reducible.

Muchos sustratos son oxidados por enzimas conocidas como **deshidrogenasas**, así llamadas a causa de que sustraen dos iones hidrógeno y electrones del sustrato. Como la mayoría de las enzimas, las deshidrogenasas son específicas para su sustrato particular. En el ciclo de Krebs hablamos de una α -cetoglutarato deshidrogenasa, de una malato deshidrogenasa, de una succinato deshidrogenasa y así por el estilo. En algunos casos, **la deshidrogenasa es una flavoproteína, porque consiste de una proteína más un grupo prostético**, en este caso una flavina, constituyendo ambos la enzima activa. El aceptor de hidrógeno para algunas deshidrogenasas es el DNA, otras emplean específicamente el DNAF y aún otras, pueden usar ya sea el DNA o el DNAF. Estas se conocen como **coenzimas** por que participa en la reacción directamente, aceptando electrones y, por lo tanto, reduciéndose.

El siguiente paso en el esquema del transporte de electrones la oxidación del DNAH₂ por medio de una reductasa del mismo; esta enzima es una flavoproteína, en la cual, el grupo prostético, flavina adenina dinucleótido, o FAD, se reduce y se oxida, participando así en la reacción. Parece que existen dos flavoproteínas en este punto, en la cadena del transporte del electrón, una que acopla, o trabaja, con la deshidrogenasa sucinta, y la otra que lo hace en conjunción con el resto de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs. En el primer caso, los electrones del succinato son transportados directamente a la flavoproteína, en tanto que en el segundo caso,

los electrones van primero al DNA y después, del DNAH₂ al grupo FAD de la flavoproteína.

Estas dos flavoproteínas reducidas, donan luego sus electrones a un aceptor común, el citocromo b, el cual, entonces, se reduce. A su vez, el citocromo c₁, el citocromo a y el citocromo a₃. Se reducen y se oxidan alternativamente por el paso de electrones.

En alguna parte, a lo largo de esta cadena, está implicado un nuevo portador, últimamente descubierto, la **coenzima Q₁₀**, una quinona químicamente relacionada con la vitamina K.

Finalmente, la enzima citocromoxidasa, que parece ser la entidad que ahora denominamos más sucintamente citocromo a y citocromo a₃, cataliza la transferencia de electrones e hidrógeno al oxígeno para formar agua. Todos estos citocromos son hemoproteínas, en las cuales el hierro en el centro del Hem, se oxida y se reduce, alternativamente. Este envío de electrones del sustrato al oxígeno tiene lugar, porque el potencial de energía de cada uno de los portadores intermedios es tal, que el hidrógeno o los electrones van de un compuesto con un potencial reductor elevado a otro con un potencial reductor bajo. Es como si la cadena transportadora de electrones estuviera formada por una serie de cascadas: el agua parte de un nivel de energía elevado, el sustrato, y termina en un nivel de energía bajo, el oxígeno; esto es, un flujo de una sola dirección.

Sin embargo, el flujo de electrones puede invertir, bajo ciertas condiciones como, por ejemplo, poniendo energía dentro del sistema, justamente como el agua se la puede hacer subir, si se aplica energía (véase más adelante).

Fosforilación oxidativa

Es lógico preguntarse por qué la célula emplea este complicado medio de capturar la energía en el sustrato. La razón parece ser que, químicamente, es más eficiente romper la gran diferencia en potencial de energía entre el sustrato y el oxígeno en muchas etapas pequeñas; y esto es precisamente lo que hace la cadena transportadora de electrones. En cada cascada, la energía latente en la configuración química del sustrato, no es solamente capturada, sino transformada en una forma química que pueda utilizar la célula. Nosotros sabemos actualmente, casi con precisión, dónde están localizadas estas "cascadas" transformadoras de energía en la cadena transportadora de electrones, son los sitios donde tiene lugar la producción del TFA, y de esa manera están designadas en la Fig. 11-3.

De manera que podemos decir que la fosforilación transportadora del electrón es el acoplamiento de la fosforilación de un fosfato inorgánico con difosfato de adenosina (DFA) para dar el trifosfato de adenosina (TFA), con la transferencia concomitante de electrones de un donador a un aceptor. Tenemos una idea de cómo ocurre esto (véase más adelante). Sabemos con más precisión, que tiene lugar durante la oxidación del DNAH₂, durante la oxidación del citocromo b reducido y, probablemente, durante la oxidación del citocromo c reducido. Así, para cada sustrato oxidado a través del DNA -es decir, oxidado por un DNAH₂ acoplado con una deshidrogenasa- existen tres moléculas de TFA formadas por cada átomo de oxígeno

que es reducido, para dar una molécula de agua. En el caso de la oxidación del succinato, la etapa del DNA es desviada y se forman dos moléculas de TFA por cada átomo de oxígeno que es reducido. En algunos casos como en la oxidación del α -cetoglutarato, durante su oxidación por el DNA, hay igualmente un paso de fosforilación, la formación de TFG o de TFA; este es un ejemplo de la llamada fosforilación de sustrato, la producción de energía bajo forma de TFA por la oxidación directa del sustrato. Otro ejemplo de esto es la oxidación del fosfato-3-gliceraldehído a ácido 1,3-difosfoglicérico y la conversión de este último en ácido fosfoglicérico y TFA (Fig. 14-2).

En el caso del α -cetoglutarato, su oxidación dará por lo tanto, cuatro moléculas de TFA por cada átomo de oxígeno reducido.

Esta relación de moles de fosfato inorgánico esterificado para formar TFA por átomo de oxígeno consumido durante la oxidación, se denomina relación P/O. Es unamedida de la energía producida por la oxidación de un sustrato; en el caso del α -cetoglutarato son cuatro, con el succinato son dos, con el malato son tres y con el DNAH₂ son tres también. **Este proceso completo, de la fosforilación oxidativa, se mide sencillamente, añadiendo sustrato a los mitocondrios y observando el consumo de oxígeno y la desaparición del fosfato inorgánico.** Las relaciones de P/O que se observaron durante la oxidación del sustrato, mostraron que por cada par de electrones transferidos al oxígeno, tuvo lugar más de un paso de fosforilación. Datos como éstos, produjeron la teoría de la fosforilación por medio del transporte del electrón.

Control de la respiración

El término, fosforilación acoplada, necesita una explicación. En los mitocondrios trabajando, no tiene lugar la oxidación de muchos de los sustratos en el ciclo de Krebs sin la fosforilación concomitante. Esto se puede demostrar muy fácilmente por estudios efectuados con mitocondrios aislados. Se ha observado muchas veces que los mitocondrios no oxidan al α -cetoglutarato o al piruvato en ausencia de fosfato inorgánico y DFA.

En presencia de fosfato inorgánico, pero sin DFA, no hay oxidación; tan pronto como se añade DFA, el sustrato se oxida, desaparece el fosfato inorgánico, y se forma el TFA. Este acoplamiento de la fosforilación para la oxidación es obligatorio; es decir, normalmente los electrones no son transportados a menos que tenga lugar una síntesis de TFA. El DFA es un componente necesario con el fin de que el fosfato inorgánico sea aceptado para formar el TFA; la adición de éste únicamente, tiene muy poco efecto sobre la oxidación.

Sin embargo, si el TFA se descompone para formar DFA, la oxidación se asegura y el DFA es entonces refosforilado a TFA. Esto último se puede hacer muy fácilmente, añadiendo la enzima hexoquinasa, la cual cataliza la transferencia del fosfato del TFA a la glucosa para formar el fosfato-6-glucosa y el DFA, este último necesario para que se verifique la oxidación.

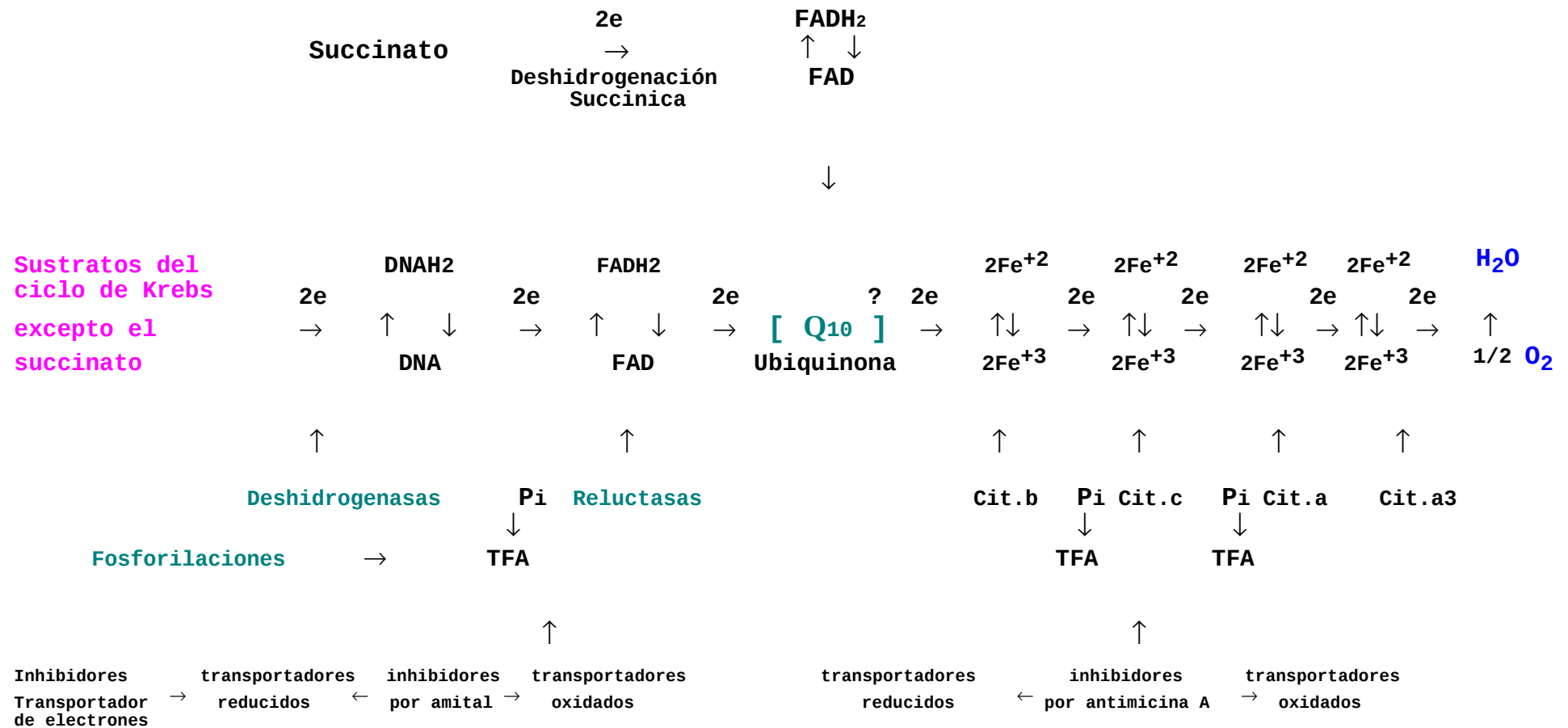


Fig. 11-3 Cadena transportadora de electrones, mostrando los sitios de Fosforilación y los de inhibición de transportadores.

La Tabla 11-2 muestra un experimento típico, en el cual, la adición de hexoquinasa, en presencia de TFA y glucosa, origina un aumento en la oxidación del piruvato y del fumarato. Este efecto del DFA se llama efecto del "aceptor fosfato" en el aumento de la oxidación. De igual manera, experimentos similares han mostrado la necesidad de que fosfato inorgánico

TABLA 11-2. EFECTO DE LOS ACEPTORES FOSFATO SOBRE LA VELOCIDAD OXIDATIVA

Adiciones	Velocidad oxidativa	
	piruvato y fumarato como sustratos	glutamato como sustrato
TFA, fósforo inorgánico	12	8
Fósforo inorgánico	18	12
DFA, fósforo inorgánico,	75	101
TFA, fosforo inorgánico, hexoquinasa, glucosa	80	116

esté presente, para que tenga lugar la oxidación; la razón es precisamente la misma que para el caso del DFA. Experimentos como éstos han establecido firmemente las bases de la fosforilación oxidativa acoplada del sustrato en los mitocondrios. En el siguiente capítulo se discutir el posible significado de esto para la regulación de ciertos aspectos del metabolismo celular.

CINETICA DEL TRANSPORTE DEL ELECTRON Y FORMACION DEL TFA

En años recientes, el trabajo brillante de Chance y sus colaboradores comprobaron la existencia de la cadena transportadora del electrón en los mitocondrios de células completas aisladas, y aún más recientemente, en varios tejidos animales *in situ*. Además, este grupo ha dilucidado la cinética del transporte del electrón. A través del empleo de micro-métodos de electrodos de oxígeno para medir el consumo de oxígeno, de la espectrofotometría de flujo rápido de doble destello y de mediciones simultáneas de los estados reducidos y oxidados de los transportadores del electrón, se ha podido verificar la secuencia de éstos a lo largo de la cadena. En lugar de medir

la respiración por su producto final, el consumo del oxígeno, se ha medido por la reducción, no del oxígeno, sino de los transportadores de electrones intermediarios. Puesto que cada uno de los transportadores de electrones tiene un espectro de absorción característico en los estados oxidados y reducidos, la medición de la concentración en los picos de absorción proporciona una estimación del porcentaje del compuesto que se ha reducido o se ha oxidado.

Además, como resultado de estas técnicas, sabemos ahora exactamente dónde se forma el TFA a lo largo de la cadena.

Previamente, partes separadas de la cadena pueden ensayarse para conocer sus relaciones P/O; la oxidación de una mol de citocromo c reducido da un mol de TFA, la formación del cual debe tener lugar entre el citocromo c y el oxígeno; la oxidación del succinato da 2 moles de TFA, la otra teniendo lugar entre la ligadura del succinato con la flavoproteína y el citocromo c; la oxidación del DNA da tres moles de TFA, la tercera tiene lugar entre el DNA y el citocromo b. El resultado muy interesante del trabajo de Chance es que llegó exactamente a la misma conclusión empleando métodos radicalmente diferentes. Simplemente su método consistió en mediciones de estados de oxidación y de reducción de los diferentes componentes de la cadena bajo condiciones en donde (1) no se añadió substrato, (2) se añadió substrato adecuado, pero no DFA, y (3) fueron añadidos substratos y DFA adecuados. Por ejemplo, si los mitocondrios están urgidos de substrato todos los transportes de electrón son oxidados; durante la oxidación del substrato y la fosforilación subsecuente, ellos son reducidos. Sin embargo, si se añaden a los mitocondrios substratos y pequeñas cantidades de DFA, la respiración rápidamente aumenta hasta que todo el DFA se ha fosforilado a TFA, en cuyo momento, la velocidad de la respiración comienza a decaer estrepitosamente. Observando los cambios de los estados de oxidación-reducción de varios componentes, durante el último estado inhibido de la respiración, se pueden identificar puntos a lo largo de la cadena -los llamados puntos de "entrecruzamiento"- como sitios de conversión de energía a una forma que pueda ser utilizable para la fosforilación del DFA. Bajo estas condiciones, tienen lugar reducciones del DNA, de la flavoproteína y de los citocromos b y c; y una oxidación del citocromo a. El punto de "entrecruzamiento" se encuentra así entre el citocromo a y el c, implicando este sitio como uno de aquellos, en los cuales, puede tener lugar la formación del TFA. Estos resultados fueron comparados con los experimentos que involucran a los inhibidores del transporte de electrones conocidos, como la antimicina A y el amital. Estos reaccionan con los componentes de la cadena, como se muestra en la Fig. 11-3, y originan una reducción de alguno de ellos y una oxidación de otros, identificando de esta manera sus puntos de inhibición. Así, las conclusiones están ahora firmemente deducidas de los sitios de formación del TFA, y aun, la forma posible de cómo se efectúa.

Además, podemos calcular ahora, por este método, la cantidad de cada uno de los transportadores en la cadena. Parece que éstos existen en distintas relaciones estequiométricas entre entre sí; todos los citocromos y las flavoproteínas se encuentran casi en igualdad de concentraciones con, aproximadamente, diez veces más de nucleótidos de piridina. De estos valores y de los datos conocidos del volumen mitocondrial y del contenido de proteínas, se puede calcular el número de

conjuntos respiratorios para cada mitocondrio; estas cantidades, en números, se encuentran entre 5000 y 10000 conjuntos de cadenas transportadoras de energía.

Conceptos de la fosforilación acoplada

Otro conocimiento satisfactorio de este método fue el establecer firmemente el papel de los aceptores de fosfato como el fosfato inorgánico (P_i) y el DFA, en los ciclos de oxidación y de reducción de los transportadores. Los cambios inmediatos en la reducción de estos transportadores de electrones que se verifican en segundos, después de la adición del DFA, sugieren firmemente que tiene lugar verdadera unión química entre el transporte del electrón y la fosforilación. Del esquema representado en la Fig. 11-4, se puede inferir que no solamente el transporte de electrones es reversible, sino que el flujo de energía a lo largo de la fosforilación también puede ser reversible.

Recientemente se ha mostrado que al añadirse juntos succinato y TFA, la coenzima DFN es reducida a DFNH₂. Esto se puede explicar mediante el concepto que después de la oxidación del succinato por su flavoproteína, los electrones fluyen primero

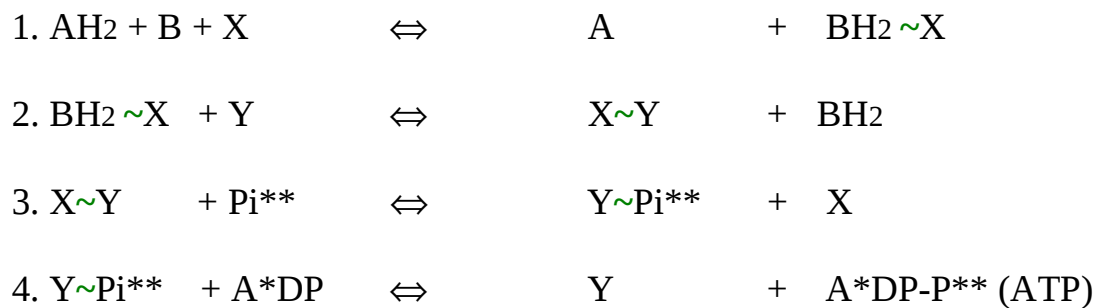


Fig. 11-4. Esquema hipotético aceptado actualmente para la unión del transporte de electrones con la fosforilación. A y B son transportadores de electrones; X y Y son los compuestos de unión hipotéticos; Pi es el fosfato inorgánico; Pi^{**} es el fosfato inorgánico radiactivo y el DFA* es el difosfato de adenosina radiactivo

al citocromo b; luego, en lugar de que los electrones fluyan al citocromo c, la elevada energía del TFA añadido causa una regresión, y los electrones van hacia la reductasa del DFN, originando la reducción de éste. Así parece que el TFA es la fuente de energía necesaria para dirigir esta reacción hacia adelante, en contra del potencial electroquímico. La fuerza de unión entre el transportador de electrones y la fosforilación está ampliamente ilustrada por la facilidad con que se verifica esta reacción reversible.

No sabemos cómo tiene lugar esta unión, pero tenemos una ligera idea de los pasos enzimáticos individuales que deben estar implicados. El esquema dado en la Fig. 11-4, se ha desarrollado de los trabajos e ideas de bioquímicos tales como Lipmann, Slater, Lardy, Lehninger y Hunter, y está aceptado en la actualidad. La idea central es que la unión entre el transporte de electrones y la fosforilación asociada tiene lugar a través de un intermedio común a ambos tipos de estas reacciones. No es necesario que así sea, pero es la hipótesis más sencilla que se debe tomar en consideración en la actualidad y que parece se ajusta a las observaciones conocidas.

La evidencia experimental de que los fosfatos inorgánicos no son necesarios para el transporte de electrones *per se*, indica que este intermediario común no involucra ni al Pi ni al DFA. Por lo tanto, se ha postulado que un transportador reducido (AH_2) reacciona con el siguiente transportador en línea (B) en presencia de otra sustancia (X), reduciendo a B para dar BH_2 . Al mismo tiempo, un enlace de elevada energía (símbolo $\sim$) aproximadamente del mismo contenido de energía como es el del TFA, se forma entre BH_2 , y X dando ($BH_2\sim X$). El último compuesto reacciona entonces con otra sustancia hipotética (Y) para formar un intermediario de elevada energía ($X\sim Y$). En el siguiente paso entra, finalmente, Pi formando ($Y\sim Pi$) y otra vez se pone en libertad a X. $Y\sim Pi$ entonces se une con el DFA para formar, al fin, TFA y poniendo, otra vez, en libertad a Y. Así, $X\sim Y$ es el intermediario común a ambos, tanto de los transportadores de electrones como de las enzimas de fosforilación.

La evidencia para este esquema se ha obtenido de diversas maneras. Uno puede predecir que las reacciones (3) y (4) deben ser reversibles, involucrando, como lo hacen, a compuestos de aproximadamente igual contenido de energía. Un medio para demostrar esto, implica el uso del compuesto 2,4-dinitrofenol; este compuesto se ha conocido desde hace algún tiempo que es un desligante de la fosforilación oxidativa, puesto que en presencia de pequeñas cantidades del compuesto, sustrato y DFA, la oxidación prosigue a un ritmo rápido, pero no se verifica la fosforilación. Este compuesto es también un activador de una adenintrifosfatasa mitocondrial, separando al Pi del TFA. Todos estos hechos se pueden explicar, postulando que el dinitrofenol actúa descomponiendo a $X\sim Y$ para poner en libertad a X y a Y y así $X\sim Y$ no puede actuar como aceptor de Pi para formar TFA.

Las otras dos reacciones parciales de la secuencia de la fosforilación se han descrito ya; ambas son inhibidas por el dinitrofenol, por lo cual están implicadas en la unión del transporte de electrones con la fosforilación. Una es la reacción de intercambio entre Pi y el fosfato terminal del TFA, medida por medio de la mezcla de mitocondrios con Pi radiactivo y TFA no radiactivo y midiendo la radiactividad en el TFA aislado. La otra es una reacción de intercambio similar entre el DFA y el TFA, medida por medio de la incubación de mitocondrios con DFA marcado en sólo mitad de adenosina y de Pi y después contando el TFA marcado. Estas son reacciones de verdadero intercambio en las que no existe una síntesis neta de cualquiera de estos compuestos; no sale más TFA del que se puso. La reacción (3) más la (4) pueden explicar la reacción de intercambio Pi-TFA, y la reacción (4) puede explicar el intercambio de DFA-TFA. Las identidades de los acopladores hipotéticos, X y Y se desconoce.

Ambos, o ninguno, puede ser una enzima fosforilada. Recientemente, compuestos tales como un DNA "activado", ligado a una enzima, o un citocromo c "activado" ligado a una enzima o una histidina fosforilada ligada a una enzima, todos han sido implicados como que funcionan en algún punto de este esquema.

También ciertas quinonas, como la vitamina K o ubiquinona, otra transportadora de electrones mitocondrial recientemente identificada se ha creído que está involucrada, tal vez siendo el compuesto X. Finalmente, no sabemos si estos propuestos Y y X son los mismos en los tres lugares de fosforilación a lo largo de la cadena, o si existen diferentes acopladores en cada lugar. Puesto que estas reacciones parciales de fosforilación están íntimamente ligadas a la cadena transportadora de

electrones, se puede esperar que el estado de reducción de los transportadores de electrones, tiene algún efecto sobre las proporciones de estas reacciones parciales; y, ciertamente, éste es el caso.

Partículas submitocondriales

El motivo de tanta dificultad, que se ha encontrado en la solución de este problema del mecanismo, reside en el hecho de que los conjuntos respiratorios con sus fosforilaciones asociadas, son una parte de las membranas de los mitocondrios con lipoproteínas insolubles. Los laboratorios de Lehninger y Green han efectuado grandes adelantos al intentar fragmentar estas unidades plurienzimáticas complejas en piezas laborables.

Estos fragmentos de membrana, que pueden aislarse rompiendo los mitocondrios por medio de detergentes tales como la digitonina o el colato, se convierte en mitocondrios minimizados, pues parece que los conjuntos respiratorios, se expanden de una manera uniforme sobre todas las membranas mitocondriales intactas. Quizás ellos sean los pequeños gránulos, de aproximadamente 70 Angstroms de diámetro, que se han visto recientemente en micrografías electrónicas especialmente preparadas y que se muestran figurativamente en la Fig. 11-2. Una idea tentativa de que son las membranas crestadas y no las membranas exteriores de los mitocondrios, los lugares de estos conjuntos, se deduce del hecho observado de que los mitocondrios del corazón, que tienen más crestas por mitocondrio que los mitocondrios del hígado, tienen también un contenido más elevado de pigmentos respiratorios y una proporción oxidativa más alta. Estas crestas son, al igual que otras estructuras membranosas lipoproteínas (véase Cap. 15); por lo tanto, se cree que los conjuntos respiratorios sean realmente complejos de lípido proteína (enzima). Se vislumbra que el lípido actúa como una sustancia cementante específica, uniendo rígidamente determinado portador con su vecino más próximo. Así se cree que el transporte de electrones tiene lugar, no por colisiones moleculares entre los componentes de la cadena, durante las cuales los electrones son transferidos, sino por medio de un verdadero flujo de electrones, posiblemente a través de la matriz proteica del transportador, de un transportador colocado rígidamente al siguiente. Estas partículas diminutas, de naturaleza lipoproteica, se han denominado. PTE, partículas transportadoras de electrones. Junto a estas partículas, pero todavía siendo parte de las membranas, se encuentra la mayor parte de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs y las enzimas proteínicas que están implicadas en las reacciones de fosforilación mencionadas anteriormente.

Recientemente se han hecho intentos de fraccionar aún más este complejo diminuto de plurienzimas. Se han obtenido partículas más pequeñas que contienen algunos de los componentes y carecen de otros. En esta forma, trabajando con esta mezcla de partículas y deseando conocer algunas de sus propiedades, esperamos colocarlas, juntas en un panorama químico significativo, lo que es actualmente un rompecabezas. Algunos de estos fragmentos de membrana mitocondrial son en sí mismos, conjuntos completos de transporte de electrones y de cadenas de fosforilación. Similarmente, el sistema de la secuencia de la fosforilación puede ser transformado en fragmentos, como, por ejemplo, aquellos que contienen solamente la

adenintrifosfatasa del dinitrofenol activado. Se puede apreciar ahora la estructura del mitocondrio; podemos compararlo con una máquina eficiente, organizada estructuralmente para una rápida transducción de energía oxidativa química utilizable.

Eficiencia de la fosforilación como una transductora de energía

Vamos ahora a reflexionar acerca de lo que realmente sucede con la energía almacenada dentro de una molécula de glucosa en la célula. Si esta glucosa es completamente quemada en un tubo de ensayo proporcionar alrededor de 690000 calorías de energía por mol, todas ellas como calor. Sin embargo, en la célula, parte de esta energía no se pierde como calor sino que es retenida bajo la forma de TFA. La primera reacción que la glucosa sufre en la célula es la serie de reacciones llamada esquema de Embden-Meyerhof de la glicólisis anaeróbica (véase Fig. 14-2). El primer paso en este proceso es la fosforilación de la glucosa por el TFA por medio de la enzima hexoquinasa para formar el fosfato-6-glucosa. Este último compuesto es luego convertido enzimáticamente a fosfato-6-fructosa, el cual reacciona entonces con otra molécula de TFA para formar el difosfato de hexosa, o sea el difosfato-1, 6-fructosa. Este compuesto va entonces a través de una serie de reacciones hasta que finalmente termina como dos moléculas de 3-fosfogliceraldehído. Este compuesto, a su vez es oxidado por el DNA para dar el ácido 3-fosfoglicérico y DNAH. Esta reacción es realmente un paso de fosforilación acoplada ya que ocurre en presencia del DFA y fósforo inorgánico, con lo cual se forma TFA.

Todos los pasos enzimáticos mencionados anteriormente, se verifican por medio de enzimas solubles, que no se encuentran en los mitocondrios. Se necesitan dos moléculas de TFA para que empiece la glicólisis de la glucosa y durante la reacción oxidativa de la glicólisis, se recuperan estas dos moléculas de TFA.

Los siguientes pasos tienen lugar en los mitocondrios. El DNAH₂ que se formó como resultado de la oxidación del 3- fosfogliceraldehído es oxidado vía la cadena transportadora de electrones para formar tres moléculas más de TFA. El resultado final de las reacciones glicolíticas es la producción del ácido pirúvico: en ellas, dos moles de ácido pirúvico se forman a partir de cada mol de glucosa. Este ácido pirúvico penetra en los mitocondrios y es oxidado por el DNA, dando al final, cuatro moles de TFA. El compuesto de dos carbonos que se forma, la acetil-coenzima A, se condensa para formar el citrato, como se explicó en el capítulo anterior. El siguiente paso productor de energía es la oxidación del isocitrato a oxalsuccinato por medio del DNA, formándose DNAH₂, cuya oxidación da entonces tres moléculas más de TFA. El siguiente paso es la fosforilación a un nivel del substrato del α -cetoglutarato a succinil-coenzima A para dar un TFA más, vía el TFG. El DNAH₂ que se forma como resultado de esta oxidación, es oxidado a lo largo de la cadena transportadora de electrones para dar tres moléculas de TFA. Sumando todas estas fosforilaciones dan 19 moles de TFA, formadas desde la oxidación del piruvato hasta la formación de CO₂, y agua; pero como hay dos moléculas de piruvato procedentes de una mol de

glucosa, esta sola mol de glucosa, en la glicólisis y en la oxidación, da 38 moléculas de TFA.

El TFA es el compuesto llamado de "elevada energía". Con esto queremos decir que si es rota una ligadura ordinaria del éster fosfato como la del fosfato-6-glucosa, se obtienen aproximadamente 3000 calorías de energía por mol, pero si es hidrolizado el TFA, la energía desprendida del grupo fosfato terminal del TFA es aproximadamente de 10000 calorías por mol. Multiplicando todos los TFA formados durante el metabolismo de la glucosa nos da $38 \cdot 10\,000 = 380\,000$ calorías.

Esto es, aproximadamente, el 55% de la energía total de la glucosa; en otras palabras, el proceso es 55% de eficiente –un gran porcentaje. Probablemente cerca del 90% de la energía liberada en el desdoblamiento de los alimentos, tiene lugar durante el proceso del transporte de electrones. Así, podemos observar que la mayor parte de la conversión de energía -conversión de esa energía inherente en una estructura química del sustrato a energía inherente en la configuración del TFA tiene lugar en los mitocondrios.

Membranas mitocondriales

Las membranas mitocondriales son similares a las otras en cuanto a ser semipermeables; es decir, algunos sustratos, principalmente el citrato, tienen dificultad en atravesar las membranas, en tanto que los iones como el K^+ , son aparentemente tomados en contra el gradiente de una concentración. Nuevamente, al estar rodeados de tales estructuras, los mitocondrios se comportan como osmómetros, en cuanto a que incorporan agua y se hinchan cuando se los coloca en soluciones hipotónicas. Bajo ciertas condiciones de hinchamiento, pierden algo de sus componentes solubles de peso molecular más bajo, como los nucleótidos de la adenina y las coenzimas DNA y FDNA y, por lo tanto, pierden su poder oxidante. Lehninger ha encontrado que ciertas clases de hinchamientos -por ejemplo, los originados por la adición de iones fosfato- son reversibles; un buen agente reversible es el TFA. Los mitocondrios hinchados bajo estas condiciones se contraerán por medio de adiciones de TFA, extrayendo agua. Ciertamente tomando en consideración medidas muy exactas, se ha concluido que durante el paso de electrones que se verifica cuando es oxidado el sustrato y, por lo tanto, cuando tiene lugar la fosforilación, se efectúan diversos cambios en el volumen -y, por ende, en la forma- del mitocondrio. Es posible que los mitocondrios contengan una proteína contráctil que responda a la adición del TFA, porque ésta es casi la misma situación que se encuentra en la contracción de las fibrillas musculares (véase Cap. 14).

Lo que tiene que ver la contracción y el hinchamiento alternados de los mitocondrios, con el funcionamiento de este orgánulo, es incierto. Pero la principal función de los mitocondrios no es precisamente fabricar TFA, sino su secreción a otras partes de la célula. Por consiguiente, se cree que estos cambios en las propiedades de permeabilidad de la membrana mitocondrial, como lo indican los cambios de volumen efectuados por los mitocondrios, tienen algo que ver con la necesidad de secretar TFA. Además del efecto aceptor de fosfato observado anteriormente, cualquier influencia intra o extramitocondrial sobre las propiedades de permeabilidad

de la membrana mitocondrial, puede ser un dispositivo regulador para la función mitocondrial.

La membrana es una estructura netamente funcional. Los mitocondrios, y particularmente sus membranas, son un ejemplo sutil de la unión de la naturaleza para proyectar y hacer funcionar una estructura que provea de la más grande eficiencia de flujo. Por alguna razón se han llamado a los mitocondrios "**la usina de la célula**".

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

CHANCE, B., and WILLIAMS, G. R., "Respiratory chain and oxidative phosphorylation," *Advances in Enzymology*, vol. 17 (1956), p. 65.

DE DUVE, C., and BERTHET, J., "Use of differential centrifugation in the study of tissue enzymes," *International Review of Cytology*, Vol. 3 (1954), p. 225.

ERNSTER, L., and LINDBERG, O., "Animal mitochondria," *Annual Review of Physiology*, Vol. 20 (1958), p. 13.

GREEN, D. E., "Electron transport and oxidative phosphorylation," *Advances in Enzymology*, Vol. 21 (1959), p. 73.

---- and FLEISCHER, SIDNEY, "Mitochondrial system of enzymes." In Greenberg, D. M. (ed.), 1960. *Metabolic pathways*. New York: Academic Press. Vol. 1, p. 41.

---- and HATEFI, Y., "Mitochondrion and biochemical machines," *Science*, Vol. 133 (1961), p. 13.

HOGEBOM, G. H., and SCHNEIDER, W. C., "The cytoplasm." In Chargaff, E., and Davidson, J. N. (eds.), 1955. *Nucleic acids*. New York: Academic Press. Vol. 2, p. 199.

HOWATSON, A. F., and HAM, A. W., "Fine structure of cells," *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, Vol. 35 (1957), p. 549.

LEHNINGER, ALBERT L., "How cells transform energy," *Scientific American*, September 1961.

---- "Energy transformation in the cell," *Scientific American*, May 1960.

EL NUCLEO Y EL ALMACENAMIENTO Y TRANSMISION DE INFORMACION

Hasta ahora hemos hablado de los hechos que tienen lugar en el citoplasma; enseguida volcamos nuestra atención hacia el núcleo. Todas las células vegetales y animales contienen núcleos bien definidos, con una membrana que los rodea. **Algunas célula tienen dos núcleos, otras tienen muchos.** Las bacterias, sin embargo, contienen una región "nuclear", sin estar rodeada por ninguna membrana. A diferencia del citoplasma, que parece tener muchas funciones, todas las actividades del núcleo están enlazadas en la eterna conservación y en la exacta reproducción de información. En la actualidad, es un hecho bien establecido que **el núcleo es el depositario de los factores mendelianos, o genes; que éstos están localizados en los cromosomas; que la sustancia química principal de los genes es el ácido desoxirribonucleico (ADN), y que éste es una molécula muy grande, con un peso molecular de millones, que lleva la información que capacita a la célula para expresar su individualidad.** no sabemos cómo se verifica esto, pero estamos en el camino para su conocimiento. Este capítulo describir lo que podríamos llamar el viaje inicial a lo largo de la carretera.

Existe un colorante particular, el colorante de Feulgen, que reacciona específicamente con los desoxirribonucleótidos polimerizados, es decir, con el ADN. Por medio de este colorante se ha demostrado, incontables veces, que el ADN reside solamente en el núcleo. En realidad, el ADN es un complejo unido a una proteína básica, la histona, para formar la nucleohistona que se encuentra naturalmente. En muy pocos casos, sin embargo, en ciertos tipos de células parece que se encuentra también una pequeña cantidad de ADN en el citoplasma. La cantidad de ADN es constante; en todas las células de un tejido procedente de un animal de determinada especie, la cantidad de ADN por célula es la misma. Más exactamente, la cantidad de ADN por núcleo es la misma para todas las células somáticas de un animal en particular, y esta cantidad es el doble de la encontrada en las células germen de esa especie en particular.

Podemos ir más adelante y decir que la cantidad de ADN por determinado cromosoma es una cantidad fija y característica de esa especie. Esta concentración de ADN permanece la misma, no importa bajo qué esfuerzo metabólico o nutricional se puedan colocar a las células o al animal. Otra constante del ADN del núcleo es su estabilidad metabólica. Si se inyecta a un animal, fosfato inorgánico radiactivo, la marca radiactiva se encuentra en grandes cantidades en toda clase de compuestos que contengan fósforo, pero no habrá radiactividad en los fosfatos del ADN. Parece

ahora que una vez que se ha sintetizado el ADN de los cromosomas, ya no se desdobla. Es una molécula estable, y esto es precisamente lo que uno puede esperar de una molécula que lleva la información acerca de las propiedades de la célula. Esto no quiere decir que el ADN sea inerte, de hecho, pensamos que no lo es; como si dijéramos mejor, una vez formado el ADN, su modelo molecular está instalado y no sufre más transformaciones metabólicas. Siendo parte de los cromosomas, el ADN participa de los actos celulares (de hecho, podemos "ver" que hace esto) cuando los cromosomas se replican y se dividen durante la división celular.

DIVISION CELULAR

Esto trae a colación el asunto de la división celular; ¿porqué una célula debe dividirse? nosotros no lo sabemos con certidumbre, pero podemos hacer buenas conjeturas. Puede ser que el crecimiento de la célula, su aumento de masa, tenga cierto límite, y que, al dividirse, una célula pueda obtener más superficie por masa de sustancia celular. Con el fin de sobre vivir la célula debe tener un intercambio constante con su medio ambiente ya sea éste pequeñísimo como lo es una gota de agua, o un intermediario como lo es el torrente sanguíneo. Probablemente exista una relación límite entre la superficie de la célula y su masa, diferente para las diversas clases de células, y cuando este límite se alcanza, se divide la célula. Otra razón para la división podría ser debida a una especie de "envejecimiento" del citoplasma; la división de la célula permitiría así al núcleo celular, o material nuclear, recoger de su alrededor citoplasma fresco y no excederse todavía de la relación límite de volumen a masa. Sobre todo, por supuesto, la principal razón para la división de la célula durante el crecimiento, es formar células nuevas y similares, hasta que se alcance el tamaño adulto del órgano. ¿Qué origina que una célula de un tejido joven se divida? y, ¿qué es lo que hace que una célula de un tejido adulto se detenga virtualmente en sus divisiones? Ambos son enigmas.

Mitosis

Sabemos de cierto, que la causa visible de la división celular es la duplicación de la sustancia nuclear. En el núcleo de una célula en "reposo" y que, por lo tanto, no se está dividiendo el llamado núcleo de "interfase" (véase la Fig. 3-7) - todo lo que aparece es una área densa, definida pero sin limitar, que es el **nucleolo**; otras áreas menos densas, no muy bien definidas, se encuentran en el nucleoplasma, o sea el área del núcleo fuera del nucleolo. Sin embargo, aunque nosotros no podemos "ver" estructuras en el nucleoplasma, sabemos con certeza que hay algún tipo de organización molecular.

Durante la división de la célula mencionada en el Cap. 3, esta organización se pone de manifiesto. Aparecen las regiones del centrosoma, una en cada extremo de la célula en división, que parece que actúan como puntos de enfoque para las fibras del huso. Estas fibras son partes de una organización, el aparato mitótico, el cual puede separarse intacto de las células en división. En el nucleoplasma se encuentran las proteínas que posteriormente, durante la división de la célula, se condensarán y así

estructuradas, formarán las fibras del huso visible a lo largo de las cuales, los cromosomas se moverán hacia cada extremo de la célula en división (véase la Fig. 3-7)

Verdaderamente, hay mucho más trabajo por hacer para determinar la superestructura del núcleo y cómo esta estructura cambia dramáticamente y con mucha rigidez durante varias etapas del ciclo nuclear.

La división de la célula somática en dos células hijas se efectúa por un proceso llamado mitosis (véase la Fig. 3-7).

Esencialmente lo que sucede en la mitosis es que se hace una exacta distribución del ADN en el núcleo del ADN que previamente se había exactamente duplicado. La mitosis comienza con la condensación del ADN, proteínas y, posiblemente, del ARN para formar hilos visibles de cromatina, los cuales se convierten en cromosomas entrelazados y enrollados que pueden observarse por primera vez. Después de la división, todo lo que puede verse del material de cromatina en el núcleo de interfase es una área densa, vaga, pero que, sin embargo, se tiñe con el colorante de Feulgen, indicando la presencia continua de contenido de ADN en los hilos. Así, podemos decir que si una célula se ha dividido, lo ha realizado de tal manera que las células hijas tienen exactamente las mismas características de la célula madre. El significado de la mitosis es de que provee de un mecanismo preciso para que esto se lleve a cabo. En términos morfológicos, esto significa una duplicación exacta del número, tamaño y arquitectura de los cromosomas, para que éstos lleven los genes mendelianos. En términos bioquímicos, esto debe significar, como hemos visto, una duplicación exacta de la estructura química del ADN.

Duplicación del ADN

El hecho inicial en la división de la célula parece ser la duplicación del contenido de ADN en el nucleolo, tenemos idea de cómo esto se inicia, pero tiene lugar antes de que la condensación visible de la cromatina forme a los cromosomas. Estamos precisamente empezando a encontrar cómo el ADN se duplica, ya que bioquímicos dirigidos por Kornberg han aislado de la célula, enzimas que realmente sintetizarán el ADN (Fig. 12-1A). Lo que la enzima necesita para que tenga lugar la reacción son los cuatro trifosfatos desoxirribonucleósidos (trifosfatos de desoxiadenosina, de desoxicitidina, de desoxi-guanosina y el de timidina), más pequeñas cantidades de ADN como iniciador. Durante la reacción, el pirofosfato inorgánico es descompuesto de los trifosfatos, con la formación concomitante de los enlaces fosfodiéster entre los nucleótidos adyacentes. La sustancia clave parece ser el iniciador. La enzima es específica para la clase de enlace que se forme entre los nucleótidos y también es capaz de trabajar solamente con los desoxirribonucleósidos; los ribonucleótidos no participan en la reacción. Sin embargo, la enzima no especificar qué clase de ADN se forma; ésta es la función del ADN iniciador. Por ejemplo, sabemos que si el ADN es extraído de varias fuentes y luego hidrolizado en sus componentes desoxirribonucleótidos, las cantidades de estos desoxirribonucleótidos entre sí, son diferentes para cada "especie" de ADN; estas proporciones parecen ser características del ADN de determinada especie. Así, en la síntesis enzimática del ADN, la clase que de éste se forma, depende de la clase de ADN que se añade como

iniciador; es decir, las proporciones entre los diversos nucleótidos en el ADN sintetizado son las mismas que aquéllas del ADN iniciador.



A



B

Fig. 12-1. A: Ecuación para la síntesis del ADN. (Según Kornberg.) B: Ecuación para la síntesis del ARN según el modelo del ADN. (Según Weiss y Hurwitz)

Además, pensamos que un rasgo característico de cada "especie" de ADN individual es que sus nucleótidos componentes están dispuestos linealmente en cierto orden a lo largo de la cadena del ADN. Y existe alguna razón para creer que el ADN que se forma durante la reacción enzimática tiene el mismo arreglo de nucleótidos a lo largo de su longitud como el que tiene el ADN que sintió de iniciador. En otras palabras, parece que el ADN iniciador, es realmente una especie de molde sobre el cual se asientan los desoxirribonucleótidos individuales, y todo lo que hace la enzima es llegar y formar el enlace fosfodiéster y cerrar la molécula.

La naturaleza de la estructura macromolecular del ADN hace a todos estos hechos extremadamente complicados. Como se discutió en el Cap. 7, el ADN nativo existe en una estructura de doble cordón, cada uno arrollado al otro en una configuración helicoidal. Estas espirales se conservan unidas por medio de enlaces de hidrógeno entre los nucleótidos, de tal manera que el ácido desoxiguanílico de una cadena está unido por medio de un hidrógeno al ácido desoxicitidílico de la otra y el ácido desoxiadenilico de una al ácido timidilico de la otra. Por lo tanto, parecería que en una reacción enzimática, en la cual el ADN de dos cordones fue añadido como iniciador y cada cordón se duplicó de tal manera que, donde el ADN iniciador tenía ácido desoxicitidílico, el ADN sintetizado contenía ácido desoxiguanílico en la posición opuesta. De manera que el ADN sintetizado era también de doble cordón; cada cordón del ADN fue copiado en una especie de espejo, resultando dos cordones cuya composición de nucleótidos combinados y cuyo arreglo de nucleótidos individuales fueron los mismos que los del ADN iniciador de doble cordón. Se ha pensado que el ADN en el material cromático del núcleo, se encuentra en la misma configuración de doble espiral, y que la duplicación del ADN en el núcleo tiene lugar

casi de la misma manera como se verifica en el tubo de ensayo. Sin embargo, **la duplicación del ADN no es un requisito para la división de la célula ya que, en ciertos casos, la duplicación tiene lugar sin que ocurra la división celular.** Pero lo inverso no es verdad; la división de la célula no se efectúa si no hay una previa duplicación del contenido de ADN.

Duplicación de los cromosomas

El siguiente acto general en la división de la célula es la etapa de **profase**; esta etapa marca el camino conveniente para reconocer a las células que están efectuando la división. En esta etapa, por primera vez, se puede observar la condensación de la cromatina en los filamentos enrollados en forma de espiral, **los cromosomas**. Se está generalmente de acuerdo en que los cromosomas, que se pueden observar en un microscopio de luz, son en si mismos, por lo menos una estructura duplicada en el sentido de que contienen dos, o quizás más, cordones equivalentes, llamadas cromátidas. Estas cromátidas son las estructuras que se separarán una de la otra en una etapa posterior. ¿Es una de estas cromátidas el nuevo ADN que fue sintetizado a partir del viejo ADN tomado como patrón?

Parece que en algunos casos cada una de estas cromátidas es, en si misma, un dúplice, habiéndose formado de "mitades de cromátidas", y que cada una de estas mitades son replicadas, de manera que en cierto momento, una espira de la cromátida contiene un cordón nuevo de ADN y uno viejo de ADN.

El siguiente experimento realizado primeramente por Taylor (Fig. 12-2), nos permite observar lo que puede suceder en la célula. A células que se estaban dividiendo activamente, se les proporcionó timidina radiactiva marcada con trítio y después se las fijó para su examen microscópico. En las células que tomaron la timidina -las que estaban produciendo una nueva generación de cromosomas antes de la división- se encontraron que todos los cromosomas estaban marcados, y la radiactividad estaba igualmente distribuida entre las dos cromátidas de cada cromosoma. Después las células fueron colocadas en un medio con timidina no radiactiva y se permitió que tuviera lugar una segunda generación de duplicación de los cromosomas. Taylor encontró, por medio de la radioautografía, que un cromosoma estaba marcado y el otro no. La forma más sencilla para explicar esto, particularmente a la luz del conocimiento bioquímico actual de la duplicación del ADN, se ilustra en el diagrama de la Fig. 12-2. Un cromosoma consiste de dos partes o cordones, cada uno de los cuales actúa como un patrón o modelo para la producción de otra parte. En un medio radiactivo, cada uno de los cromosomas, después de partirse en dos, actúa como un molde para la producción de un compañero radiactivo. Por consiguiente, todos los nuevos cromosomas están marcados. Sin embargo, cuando estos cromosomas marcados se duplican en un medio no radiactivo, los cromosomas se separarán para originar un compañero radiactivo y otro no radiactivo. Cada uno de éstos luego actúa como un patrón para la formación de una nueva cromátida, produciendo una mitad de cromosomas marcados y otra mitad que no lo está .

Esto parece bastante claro; pero cuando penetramos dentro de las pequeñas dimensiones, encontramos las dificultades.

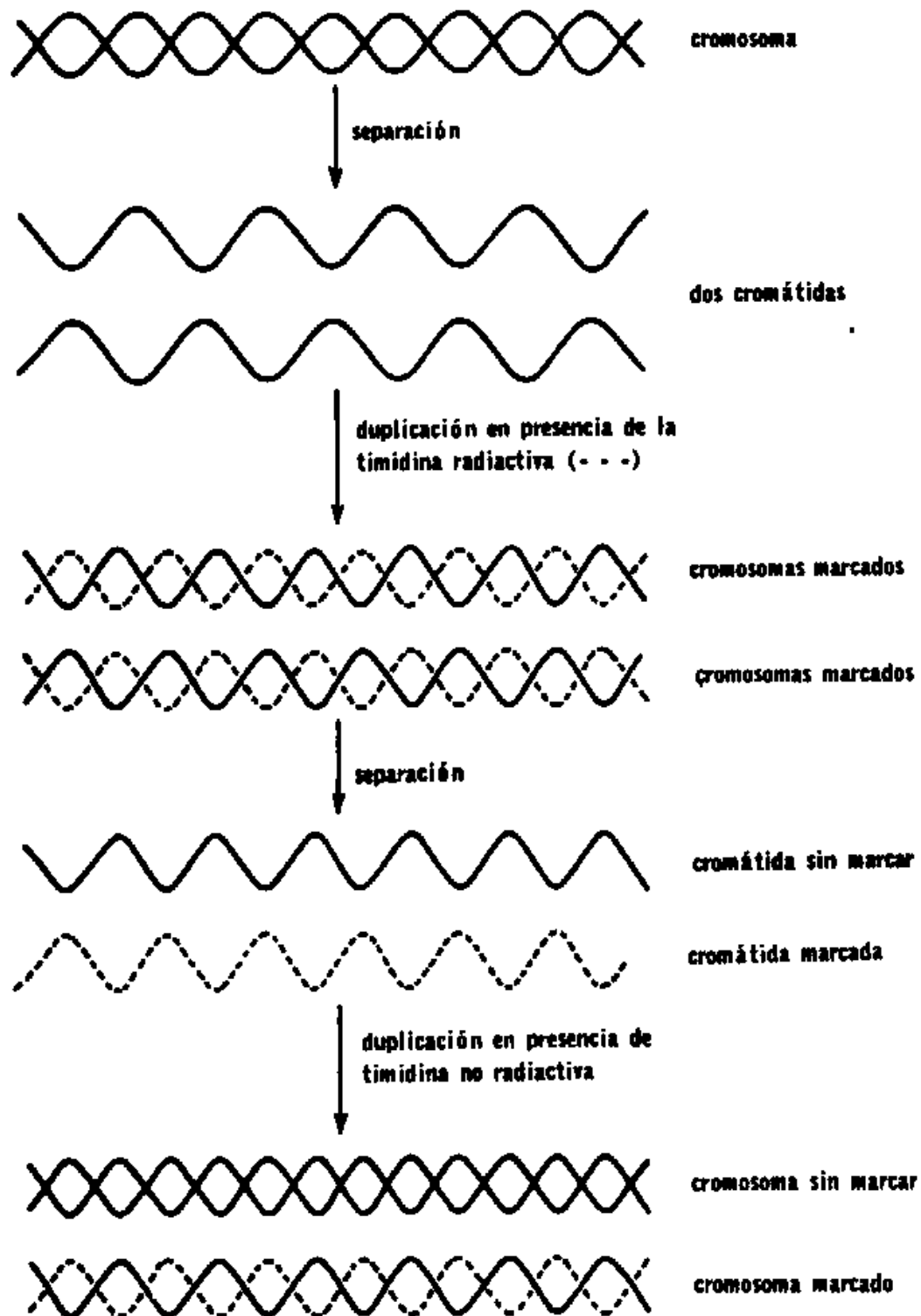


Fig. 12-2. Diagrama de los resultados de los estudios radioautográficos efectuados sobre la duplicación de los cromosomas. (Según H. Taylor)

No tenemos aún idea de la organización molecular de la cromátida, o cuántos cordones de ADN contiene, o cómo está colocado este ADN dentro de la cromátida.

Parece, sin embargo, que la configuración de doble hélice de las moléculas de ADN individuales, se refleja en el enrollamiento de los cromosomas miles de veces más grandes. Así, en tanto que a un nivel bioquímico podemos reconocer que son moléculas de ADN individuales las que se pueden duplicar, en un nivel morfológico no estamos seguros cuál estructura correspondiente se pueda duplicar, si el cromosoma completo, una cromátida, la mitad de una cromátida, o aun una subdivisión más fina del complejo visible.

Este tipo de experimento se puede hacer de otra forma como lo demostraron Meselson y Stahl, empleando células de la bacteria *Escherichia coli*; se evitan las complicaciones de la estructura cromosomal, ya que las bacterias carecen de cromosomas visibles. Las células de E. Coli pueden desarrollarse en un medio que contenga nitrógeno "pesado" (N^{15}); de esta manera todo el ADN de las células en multiplicación se marca con N^{15} . Si el cultivo en crecimiento se desvía entonces a un medio normal de N^{14} , el ADN producido ahora, contendrá N^{14} en sus bases.

El ADN de todas estas células se puede entonces extraer y con una centrifugación por largo tiempo, en un sistema de gradiente de densidad que contenga cloruro de cesio, se puede separar el ADN- N^{15} del ADN- N^{14} . Durante la centrifugación, las moléculas de cloruro de cesio más pesadas, comienzan a sedimentarse a través de la solución acuosa, estableciendo el gradiente de densidad. Las moléculas del ADN- N^{15} mucho más pesadas que las moléculas del ADN- N^{14} , se separarán en tal sistema. Si esta separación se hace en tiempos diferentes durante el experimento bosquejado anteriormente, se obtendrán los siguientes resultados. Al principio, solamente es visible una banda de ADN, que es la del ADN- N^{15} . Después de una duplicación del número de células, en presencia de timidina N^{14} , se encuentra otra vez solamente una banda, aunque en una nueva posición intermedia entre las posiciones que el ADN- N^{15} y el ADN- N^{14} habían ocupado. Después de una segunda duplicación se forman dos bandas de ADN, una en la misma posición que la banda intermedia anterior y la otra donde había aparecido la del ADN- N^{14} . La banda intermedia puede entonces ser aislada y separada, esencialmente de la misma manera, en dos bandas, una constituida por ADN- N^{15} y la otra por ADN- N^{14} . La explicación de estos resultados parece obvia. La banda intermedia se produce debido a que el ADN- N^{15} sintetizado en un medio de N^{15} sirvió luego como patrón para la síntesis de una nueva molécula de ADN- N^{14} . En la segunda división, tanto las cadenas del ADN- N^{15} como las del ADN- N^{14} sirvieron de patrón para la síntesis de nuevas moléculas de ADN. El ADN- N^{15} se une a un ADN- N^{14} para formar otra banda intermedia, en tanto que el ADN- N^{14} sirve como patrón para dar otro ADN- N^{14} , con el fin de formar una nueva banda de ADN- N^{14} . Así parece, por lo menos en las bacterias y, probablemente en todas las células, en que cada cadena de ADN pueda servir como patrón o iniciador, para la síntesis de otra cadena de ADN.

En el nivel bioquímico, parece que hemos descubierto el mecanismo de la exacta duplicación de una molécula existente de ADN para formar una nueva molécula de ADN destinada a la nueva célula hija. En el nivel morfológico, el mecanismo es un tanto oscuro, pero el resultado final es el mismo: la formación de un nuevo cromosoma que es parecido al de la célula madre.

Se cree que la inexactitud de la duplicación da por resultado lo que observamos como una mutación; la nueva cadena de ADN no es exactamente la misma que la

vieja. Pero, ¿qué presagia exactamente esta duplicación de una estructura dentro del núcleo con respecto al metabolismo del citoplasma? Hemos dicho que tanto las características nucleares como citoplasmáticas de una célula están determinadas por el material genético del núcleo, los cromosomas. En otras palabras, la síntesis de la proteína celular específica, de las enzimas y de las estructuras celulares están determinadas por la información en los genes. La pregunta es: ¿Cómo son transmitidas las instrucciones en los cromosomas al mecanismo receptor que sintetiza las proteínas en el citoplasma? El núcleo mismo tiene, por supuesto, algunos de los mismos tipos de reacciones que el citoplasma. Puede, aparentemente, hacer su propia energía bajo la forma de TFA, puesto que contiene muchas de las enzimas glicolíticas descritas en el Cap. 14. Puede sintetizar varias moléculas pequeñas y posee diversas enzimas para verificar trabajos cuya aplicación al metabolismo general de la célula no está aún claro. El núcleo tiene, por lo tanto, su propio complemento de enzimas; en algunos casos, se han encontrado los mismos tipos que en el citoplasma; en otros casos, son diferentes; pero, no obstante, estas enzimas deben estar presentes en el núcleo de la célula hija. El ADN de los cromosomas, sin duda tiene la especificación para la síntesis de estas enzimas. Pero la mayor parte del material enzimático y mucha de la maquinaria sintetizadora celular, se encuentra en el citoplasma, y la información para la duplicación de este material se halla también en los cromosomas.

PAPEL DEL ARN

La forma por medio de la cual tiene lugar la transferencia de información entre el ADN del núcleo y la maquinaria sintetizadora del mismo y del citoplasma, está ligada con el metabolismo de otro ácido nucleico, el ácido ribonucleico (ARN). En las células de los tejidos de los mamíferos, aproximadamente el 10% del ARN de la célula, se encuentra en el núcleo. De éste cerca del 20% se halla en el material denso nucleolar (el nucléolo no posee ADN, aunque tiene algo de material ADN concentrado en sus bordes). El resto del ARN está en el nucleoplasma, parte de él íntimamente unido con el material de la cromatina, y el restante, posiblemente en forma de pequeñas partículas, los ribosomas, que también se encuentran en el citoplasma (véase el Cap. 13). Se sabía, desde hace algunos años, que el ARN nuclear, tomado en conjunto, tiene un elevado ciclo. Lo que esto significa, puede ilustrarse por medio de los siguientes tipos de experimentos. Los fosfatos inorgánicos radiactivos pueden ser inyectados a un animal y luego extraer el hígado y fraccionarlo en sus diversas entidades morfológicas, tales como el núcleo, los mitocondrios, los microsomas (véase Cap. 13), y el jugo celular. En seguida se extrae el ARN de todas estas fracciones y se ensaya su radiactividad. Invariablemente se ha encontrado que el ARN nuclear total es el más radiactivo cuando se prueba a intervalos, inmediatamente después de la inyección. En efecto, en la mayoría de los casos, el ARN del nucléolo es el más radiactivo, como lo indican los experimentos radiográficos. En algunos casos, en periodos más largos después de las inyecciones, se ha encontrado que la radiactividad del ARN nuclear total ha disminuido, en tanto que ha aumentado la del ARN citoplasmático. La misma clase

de experimento se ha efectuado con la técnica de la radiautografía, empleando especímenes favorables como las células grandes del oocito; es fácil determinar en estas células si los granos de plata quedan sobre el núcleo o en las áreas citoplasmáticas. En estos casos, se ha encontrado, también, que el ARN nuclear se convierte en radiactivo más rápidamente que el ARN citoplasmático.

Los resultados de estas dos clases de experimentos conducen a la hipótesis de que el ARN es sintetizado en el núcleo, y que estas moléculas de ARN completas se dirigen entonces hacia el interior del citoplasma, no hay duda de que algo como esto sucede, pero aún permanece la pregunta de si todo el ARN de la célula es sintetizado en el núcleo o si existen dos sitios independientes para la síntesis del ARN celular, estando el otro en el citoplasma. Ciertos experimentos han sugerido la última posibilidad. Por ejemplo, empleando tipos favorables de células en las cuales se puedan verificar tales microoperaciones, ha sido posible extraer el núcleo de la célula y aún conservar un poco de célula viva, al menos por un corto tiempo. En la mayoría de los casos, se ha encontrado que no existe un aumento neto en el ARN citoplasmático después de extraer el núcleo, en tanto que en algunos casos, parece ser que la síntesis del ARN citoplasmático prosigue, aun en ausencia del núcleo. Sin embargo, como veremos en el próximo capítulo, existen diferentes clase de molécula, de ARN, verificando diversas funciones, y la pregunta de si el núcleo sintetiza todo el ARN de la célula no podrá ser contestada completamente hasta que no se desarrollen técnicas más finas para poder trabajar con fracciones de ARN separadas. Todavía más parece ser, que dentro del núcleo existen diferentes clases de moléculas de ARN, así como también en el nucléolo y en los ribosomas nucleares.

El ARN "Mensajero" o "Informativo"

Como se discutirá en el Cap. 13, se sabe que el ARN está íntimamente conectado con la síntesis de las proteínas; éste parece ser el único papel de las moléculas del ARN en la célula.

La mayor parte de esta síntesis de proteínas se efectúa en el citoplasma. De otras fuentes de información, implicando a los virus que contienen ARN y no ADN, está claro que el material genético en estos virus es el ARN. En estos casos, el ARN de estos virus en particular, efectúa la misma función que hace el ADN en la mayor parte de otros organismos y células; es decir, contiene la información para la síntesis de nueva proteína vírica. De esta manera, no solamente el ARN es muy similar en estructura al ADN, sino que, en determinados casos, verifica la misma función. De estas fuentes de evidencia se ha postulado que el intermediario entre la información del ADN en el núcleo y la síntesis de la proteína en el citoplasma es el ARN que es sintetizado en el núcleo. Realmente no había habido una prueba definitiva de esto, sino hasta muy recientemente, Como fue demostrado primeramente por Astrachan y Volkin, cuando un bacteriófago que contenga ADN como material genético, infecta a una bacteria las células infectadas sintetizan una nueva clase de molécula de ARN. Este ARN parece tener las características del ADN fago en el sentido de que las proporciones de bases del nuevo ARN sintetizado, son como un espejo de las

proporciones de bases del ADN. En otras palabras, parece haber información en el ADN para la síntesis de las moléculas de ARN semejantes a ADN.

Fue descubierto también por Weiss y Hurwitz, que podían hacerse extractos de bacterias, o de núcleos de células de mamíferos, que contienen una enzima que formar ARN, más aún, la síntesis de este ARN dependía de la presencia del ADN (Fig. 12-1B). La reacción enzimática utiliza los trifosfatos de nucleótidos, TFA, TFC, TFG y TFU; el pirofosfato inorgánico es desdoblado por cada uno de éstos, concomitantemente con la formación del enlace fosfodiéster para unir a los monofosfatos de nucleósidos resultantes con el fin de formar la cadena del ARN. La enzima es específica para los trifosfatos del ribonucleósido; no siendo convenientes los trifosfatos del desoxirribonucleósido, más todavía, como en el caso de la síntesis del ADN, la naturaleza del producto formado de ARN, depende del ADN que se añade. Se encontró que las proporciones de bases del ARN sintetizado (las proporciones relativas de los nucleótidos entre sí) eran las mismas que las proporciones de bases del ADN añadido, como en el caso de la bacteria infectada de fago. Cuando se añade un ADN diferente, que tenga distintas proporciones de sus nucleótidos, el ARN sintetizado resultante, contiene esta proporción de bases. Por consiguiente, la enzima fabricó una molécula de ARN que es una imagen de la molécula del ADN. Se puede representar que si se añade un ADN de doble cordón, cada cordón actuar como un patrón para la síntesis de una molécula de ARN.

Cuando hay ácido desoxiguanílico en el ADN, habrá ácido citidílico en el ARN; cuando se encuentre ácido tiroidílico en uno, habrá ácido adenílico en el otro. De esta manera, las dos cadenas de ARN tomadas juntas, tendrán idéntica composición de bases que las dos cadenas de ADN tomadas también juntas. Este hallazgo concretamente se ajustaría a un esquema, el cual representaría la transferencia de información del ADN al nuevo ARN sintetizado y de éste, al mecanismo que sintetiza a la proteína, tanto en el núcleo como en el citoplasma, particularmente en este último. De las evidencias tanto histoquímicas como radiográficas está claro que la duplicación del ADN y la síntesis del ARN en el núcleo, tiene lugar en momentos diferentes durante el ciclo de la división nuclear. En un momento, el ADN actúa como un patrón para la síntesis enzimática de una molécula duplicada de ADN; en otro instante, actúa como un patrón para la síntesis enzimática de una molécula de ARN similar a ella. Los medios para la regulación de esta doble función del ADN, no se conocen, pero se cree que están íntimamente ligados con la estructura macromolecular del ADN y, posiblemente, con la presencia de la **histona** que está en combinación con él.

¿Funciona la polimerasa del ARN sobre el intermediario del ADN en la célula, como lo hace en el tubo de ensayo? En los dos últimos años muchos laboratorios, principalmente los de Roberts, Spielgeman y Gres, han estado observando el comportamiento in vivo del ARN que es probablemente sintetizado por esta enzima en la célula. Se le ha denominado ARN "mensajero" o "informativo", un nombre acuñado para destacar la idea de que puede cumplir la función de transportar un mensaje del ADN nuclear a los ribosomas citoplasmáticos sintetizadores de proteínas (véase Cap. 13); así como también, de la especificidad de las proteínas que fabricarán estos ribosomas.

2 minutos de incubación

10 minutos de incubación

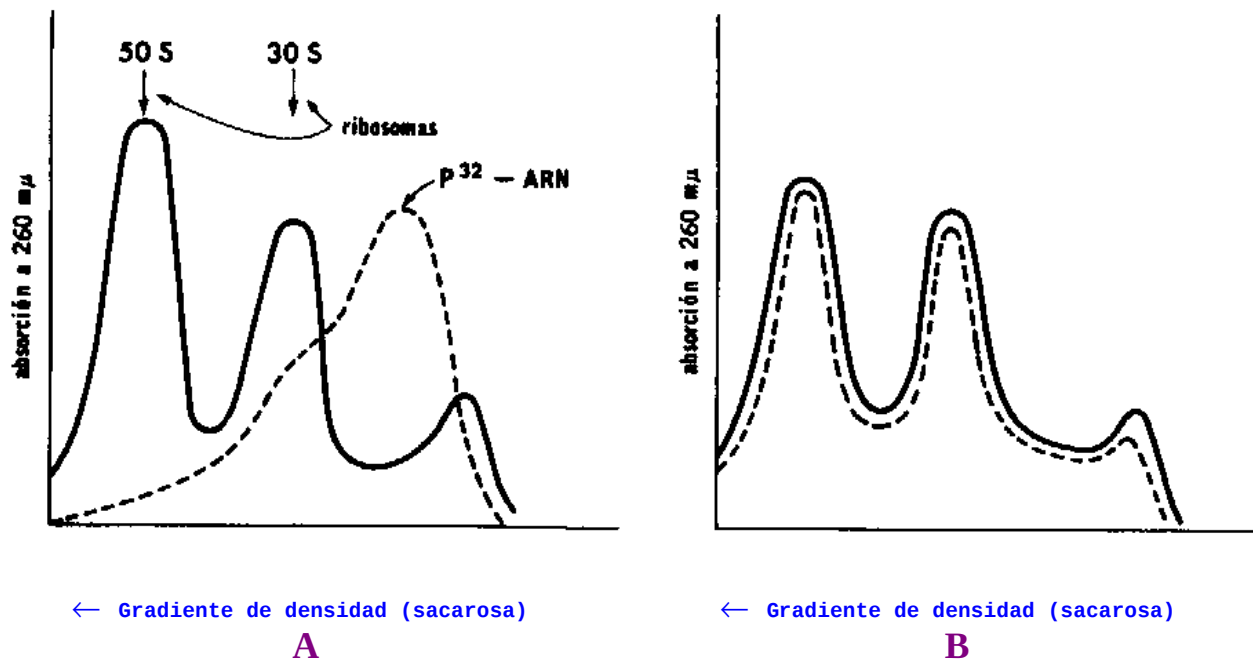


Fig. 12-3. A: Síntesis del ARN "mensajero" (ARN- P^{32}). B: Adhesión subsecuente a los ribosomas. (Datos tomados de McCarthy, Britton y Roberts)

Cuando a un cultivo bacteriano se le da un solo toque de un precursor del ARN, marcado con P^{32} o C^{14} , por un corto tiempo, se puede fácilmente observar la existencia de una fracción de ARN con un alto poder trasformativo. El sistema preferido para la separación de las macromoléculas es el de un gradiente de densidad, empleando ya sea sacarosa o cloruro de cesio, mencionados anteriormente. El ARN ribosómico ya sea en forma de ribosomas intactos o de ARN extractado, se separa fácilmente del ARN no ribosómico en tal sistema. Ambos tipos de ARN se pueden reconocer por su característico espectro de absorción en el ultravioleta, con un máximo en 260 nm. la Fig. 12-3 muestra esta separación.

Los ribosomas, bajo las condiciones particulares de este experimento, se separaron en dos fracciones, denominadas partículas 30 S y 50 S (S = unidades Svedberg, una medida en especial de tamaño). Lo que está claro es que el ARN marcado rápidamente, en este caso P^{32} , no parece ser ARN ribosómico. Pero después de 10 minutos de incubación de las células en P^{32} , la mayor parte del ARN marcado, se dirige hacia la región ribosómica. La interpretación primeramente preferida y aún sostenida por muchos investigadores en este campo de la ciencia, fue que el ARN marcado rápidamente, era todo ARN "mensajero"; después de que es sintetizado, se dirige hacia el interior de los ribosomas, y ahí, adherido, actúa como un modelo específico para la síntesis de la proteína. En lugar de la célula normal, se puede utilizar la célula infectada con fago, como lo hicieron Astrachan y Volkin; el resultado es la misma clase de esquema que se ilustra en la Fig. 12-3. Más aún, como se mencionó anteriormente, este nuevo ARN sintetizado, pareció tener la misma proporción de bases que el ADN del fago; varía marcadamente en este respecto del

ARN ribosomático en conjunto. En otras palabras, este nuevo ARN sintetizado cumple uno de los requisitos para calificarlo de "mensajero". Sin embargo, el criterio de muchos investigadores de hoy en día quizás no del mañana- es que el nuevo ARN sintetizado es, en parte, del tipo "mensajero" y, en parte, precursor del ARN ribosomático, que la diferencia entre estos dos tipos de ARN, no es simplemente que uno contenga un mensaje clave del ADN y que el otro actúe como un componente estructural de los ribosomas. no sabemos qué relaciones hay entre estos dos; quizás lo que estamos presenciando sea una imagen, pero en una escala increíblemente pequeña, de una especie de máquina registradora, con estas dos clases de macromoléculas de ARN actuando como cintas.

Sin embargo, al mismo tiempo, los investigadores están firmemente convencidos de la noción de que tal "mensajero" existe. Otra de las propiedades de este mensajero propuesto -aparte de su rápida formación dentro de la célula en ciertas circunstancias, de tener la misma composición de bases que el ADN, y de contener enzimas que pueden hacer una molécula ARN tomando como modelo a una ADN- es que este ARN mensajero tiene arreglos de bases a lo largo de su longitud, que forman una cadena complementaria a la del ADN (véase la Fig. 7-8). Si esto es así, se puede esperar que los enlaces de hidrógeno se forman entre estas dos cadenas complementarias, de la misma manera como interactúan las dos cadenas en la síntesis del ADN para formar la doble espiral unida íntimamente. Spielgeman y Hall han demostrado recientemente que esto tiene lugar. Ellos emplearon una técnica diseñada por Doty y Marmur, que verificaba la unión de los enlaces de hidrógeno, de una cadena de un polinucleótido con otra, calentando una solución, aproximadamente a 40 °C, que contuviera estas macromoléculas y luego enfriando lentamente la solución. Doty y Marmur encontraron que, durante el enfriamiento, los cordones individuales del ADN comenzaban a atraerse entre sí para formar la doble espiral; sin embargo, esto sucedía, solamente si existían grandes trechos a lo largo de estas cadenas, en donde las bases de la una se complementaban con las bases de la otra -el requisito principal para la formación de los enlaces de hidrógeno entre ellas. Este experimento puede verificarse asimismo, con una mezcla de macromoléculas de ADN y de ARN. Si bacterias *E. Coli* se infectan con fago en un medio que contenga timidina marcada con trítio, que es un precursor del ADN, se puede obtener el ADN del fago marcado con trítio (H^3). Si se incluye también en el medio P^{32} , se puede obtener un ARN "mensajero" altamente marcado. El ADN marcado con H^3 y el ARN marcado con P^{32} se pueden aislar y luego separar uno del otro por medio de un gradiente de cloruro de cesio como se muestra en la Fig. 12-4 A. Sin embargo, si a la solución que contenga el ADN y al ARN marcados, se le da el tratamiento Doty, y se centrifugan éstos, junto con el gradiente, se obtiene un resultado diferente como se muestra en la Fig. 12-4B. Un poco del nuevo ARN marcado, caracterizado por su marca P^{32} , se dirige hacia el interior de la región del ADN marcado con H^3 . Se forma, por lo tanto, un complejo que se comporta como una unidad sedimentadora individual en el sistema del gradiente de densidad. Esta formación del complejo es específica; si otro ADN -procedente de otra bacteria, del mismo *E. Coli*, o de otro fago se trata bajo las mismas condiciones de experimentación con ARN marcado con P^{32} , el resultado es el que se muestra en la Fig. 12-4A y no el de la Fig. 12-4B.

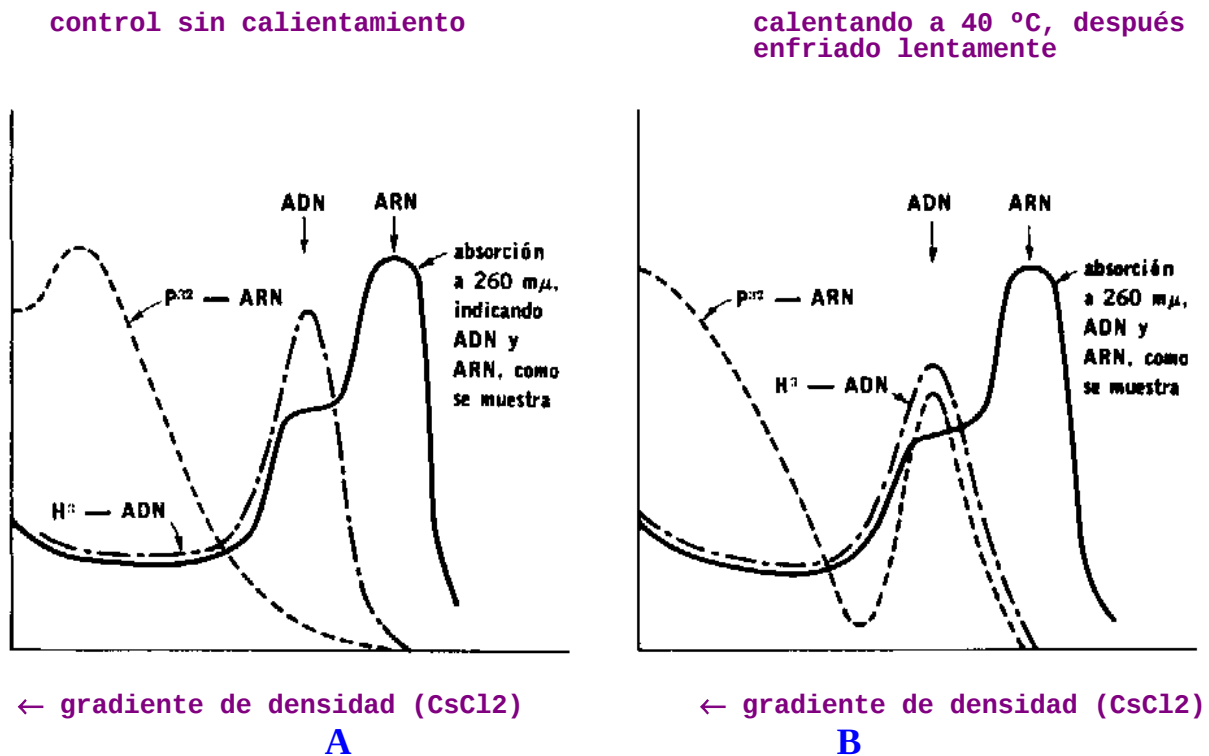


Fig. 12-4. Formación de las espirales complementarias entre el ADN y el ARN "mensajero" (ARN- P^{32}). (Datos de Hall y Spiegelman)

A la luz de todo lo que se ha dicho acerca de las estructuras del ADN y del ARN, la única interpretación que se puede hacer al presente, del porqué se obtiene un ADN-ARN híbrido en el experimento anterior, es que a lo largo de una porción grande de las cadenas del ADN y del ARN, debe haber regiones donde las bases estén colocadas en tal secuencia, que las bases del ADN se complementen con las del ARN. En otras palabras, se ha sintetizado una verdadera copia complementaria del ARN en la célula de *E. Coli* infectada con fago, que refleja, como en un espejo, una gran parte del ADN. Finalmente, en el laboratorio de Spiegelman se ha demostrado, con técnicas similares que se puede extraer el complejo del ADN y del ARN de la célula infectada con fago, conteniendo este complejo el ARN marcado y, por lo tanto, el ARN "mensajero" que se ha supuesto.

Con el fin de formar el complejo, el ADN tiene que ser de un solo cordón, puesto que intervendrá sólo el ADN desnaturalizado (de un solo cordón) y no el ADN nativo (de doble cordón). Sospechamos como resultado de otras evidencias, que solamente el ADN de un solo cordón actúa como un patrón para el ARN "mensajero". De esta manera está claro que el ADN de doble cordón, se debe desarrollar antes de que tenga lugar la síntesis de este ARN. Sin embargo, no está claro si uno o ambos cordones actúan en la síntesis del ARN. Algunos resultados experimentales apoyan esto último. Tampoco está claro si toda la secuencia del nucleótido en el ADN actúa

como un modelo para la síntesis del ARN "mensajero". Se cree actualmente, que toda la síntesis del ARN verificada en la célula, ya sea un ARN informativo como el anterior, un ARN ribosomático, o un ARN transporte, se efectúa mediante el ADN (véase el Cap. 13). no estamos seguros, por lo tanto, de que todas las secuencias de los nucleótidos a lo largo de la cadena del ADN estén implicadas en actuar como modelo para la síntesis del ARN informativo. De nuevo no se sabe si la síntesis del ARN "mensajero" tiene lugar en el núcleo, ya sea en los límites del nucleolo, donde existe material de cromatina o en el material de cromatina del resto del nucleoplasma. En el siguiente capítulo se tratará de cómo el ARN actúa en la síntesis de las proteínas.

Resumiendo, la principal función bioquímica del núcleo es doble. Actúa como un depósito de la célula para la información genética, la que, en la división de la célula se duplica exactamente para las células hijas. También se comporta como un depósito para la información que, durante toda la vida de la célula, está dando cuenta de los mecanismos enzimáticos del citoplasma exactamente cuáles y cuántas enzimas proteínicas de la célula deben sintetizarse. Todo el metabolismo del núcleo parece estar encauzado a estas funciones, no sabemos dónde tienen lugar. Tampoco estamos seguros del "significado" biológico del nucleolo, del aparato de cromatina nucleolar. Todo lo que podemos conjeturar es que, a tono con la exactitud rígida de la duplicación del ADN y la síntesis del ARN, debe haber una armazón estructural igualmente exacta sobre la cual deben apoyarse los mecanismos bioquímicos.

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

- ALLFREY, V., "Isolation of subcellular components." In Brachet, J., and Mirsky, A. E. *The cell*, new York: Academic Press. Vol. 1, p. 193.
- BRIGGS, R., and KING, T. J., "Nucleocytoplasmic interactions in eggs and embryos." In. Brachet, J., and Mirsky, A. E. (eds.), 1960. *The cell*, new York: Academic Press. Vol. 1, p. 537.
- HOROWITZ, N. H., "The gene," *Scientific American*, October 1956.
- HURWITZ, J., and FURTH, J. J., "Messenger RNA," *Scientific American*, February 1962.
- KORNBERG, A., 1962. *Enzymatic synthesis of DNA*. new York: Wiley.
- MCELROY, W. D., and GLASS, B. (eds.), 1957. *Chemical basis of heredity*. Baltimore: Johns Hopkins Press.
- MAZIA, D., "How cells divide," *Scientific American*, September 1961.,
- "Mitosis and the physiology of cell division." In Brachet, J., and Mirsky, A. E. (eds.), 1961. *The cell*. New York: Academic Press. Vol. 3, p. 77.
- MIRSKY, A. E., and OSAWA, S., "The interphase nucleus." In Mirsky, A. E., and Brachet, J. (eds.), 1961. *The cell*. New York: Academic Press. Vol. 2, p. 677.

PRESCOTT, D. M., "Nuclear function and nuclear-cytoplasmic interaction", *Annual Review of Physiology*, Vol. 22 (1960), p. 17.

STERN, H., "Function and reproduction of chromosomes," *Physiological Reviews*, Vol. 42, no. 2 (April 1962).

SWANN, M. M., "Control of cell division," *Cancer Research*, Vol. 17 (1957), p. 727.

TAYLOR, J. H., "The duplication of chromosomes," *Scientific American*, June 1958.

CAPITULO TRECE

EL RISOMA Y EL USO DE LA INFORMACION

Aproximadamente hace 15 años, los bioquímicos comenzaron a utilizar los aminoácidos radiactivos en el estudio de los procesos implicados en la síntesis de la proteína. Hasta entonces se creía que muy poca proteína se sintetizaba y se desdoblaba En las células de un organismo adulto, incapaz de crecer más. Se suponía que, una vez que eran formadas las proteínas celulares, ellas duraban por todo el resto de la vida de la célula. Hay, sin embargo, una **excreción constante de amoníaco y de urea en la orina**, y puesto que estos compuestos que contienen nitrógeno solamente pueden provenir del catabolismo de las proteínas, se supone que esta excreción continua representa la porción pequeña de las células que se está descomponiendo, siendo sus proteínas hidrolizadas y los aminoácidos resultantes desaminados para formar la urea y el amoniaco. Esta hipótesis de la estabilidad metabólica relativa de las proteínas fue conocida como la teoría del "desgaste natural"; es decir, las únicas proteínas que se metabolizaban eran aquellas resultantes de la descomposición de las células muertas o a punto de estarlo. Fue así una sorpresa encontrar que si se inyectan suficientes aminoácidos radiactivos a un animal y luego se aíslan las proteínas de los diferentes tejidos, se encuentra que estas proteínas son radioactivas. Los aminoácidos radiactivos habían llegado a incorporarse a las moléculas de las proteínas de la célula, demostrando que hay una síntesis de proteínas en las células del organismo adulto.

Este hallazgo concuerda con el concepto del "estado dinámico de los componentes del cuerpo", introducido por el bioquímico Schoenheimer, para explicar los primeros descubrimientos sobre el metabolismo de las grasas. De acuerdo con este punto de vista, todos los grandes compuestos de las células no solamente las proteínas, sino también los carbohidratos, las grasas y los ácidos nucleicos están siendo constantemente desdoblados y resintetizados en las células de un organismo que no está en crecimiento. El actual punto de vista está entre estos dos extremos: ciertamente existen algunas síntesis de proteínas que se verifican en todas las células, pero la mayor parte de las síntesis de proteínas es con el fin de formar nuevas células, o para ser transportadas fuera de ellas. Por ejemplo,

cuando se inyectan aminoácidos radiactivos al animal y se aíslan las proteínas de los diferentes tejidos, se encuentra que los tejidos más activos en la síntesis de proteínas son aquellos cuyas células forman proteínas para fines de exportación. Las células del hígado fabrican la mayor parte de las proteínas de la sangre; las células del páncreas forman la mayor parte de las enzimas proteolíticas destinadas al intestino; las células de la mucosa intestinal forman las enzimas digestivas y algunas hormonas proteicas; algunas glándulas endocrinas producen hormonas proteicas para segregarlas dentro de la sangre.

Todos estos tejidos son los que se encontraron que contenían las proteínas más radioactivas. Por otra parte se encontró que los tejidos como la piel y los músculos, contenían muy poca radiactividad en sus proteínas. De hecho, estaba bastante claro que las proteínas de los músculos por su cantidad ocupan el segundo lugar en el cuerpo, presentan muy poca descomposición y síntesis o, como se ha llamado, poco reemplazo proteínico. Sin embargo, existe algún reemplazo, no para segregar ni para formar proteínas para células hijas, sino simplemente una descomposición y resíntesis de una pequeña parte de las proteínas propias de la célula. Lo que esto significa no se sabe con exactitud hasta el presente.

Bases citológicas de la síntesis de la proteína

Podemos ir más adelante y delinear aquellas estructuras celulares que están funcionando en la síntesis de la proteína, de la siguiente manera. El homogeneizado de hígado puede fraccionarse por medio de la centrifugación diferencial en los componentes morfológicos de la célula del hígado. De esta manera se obtienen la fracción nuclear y la total de la célula, así como la fracción mitocondrial. Después de que se ha centrifugado el homogeneizado del hígado y separado la porción de los núcleos pesados y de los mitocondrios, la parte restante se centrifuga a gran velocidad; en esta forma se obtiene otro pequeño gránulo en el fondo del tubo. Este gránulo se denomina "**microsoma**" o fracción de partículas pequeñas. Cuando este gránulo se analiza morfológica y químicamente, se encuentra que contiene la mayor parte del ARN y de los fosfolípidos de la célula y que esta compuesto de fragmentos del retículo endoplasmático. Su importancia para la economía de la célula fue comprendida a través del descubrimiento de que la mayor parte de la síntesis de las proteínas de la célula tiene lugar en esta fracción. Después de que se inyecta el hígado con aminoácidos radiactivos, se extirpa y se fracciona en las porciones nuclear y completa de la célula, la mitocondrial, la microsómica y la sobrante. Se obtienen así las proteínas de estas diferentes fracciones y se mide su radiactividad. La Fig. 13-1 muestra que la fracción del microsoma es la que tiene radiactividad específica más elevada, es decir, el conteo radiactivo por minuto por miligramo de proteína.

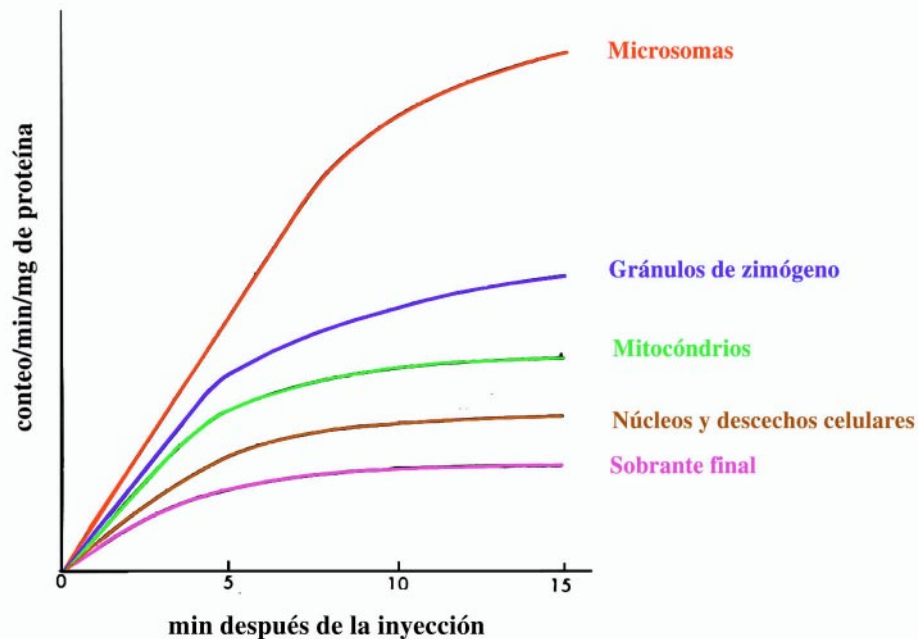


Fig. 13-1. Incorporación *in vivo* de aminoácidos radiactivos dentro de las proteínas de varias fracciones morfológicas de tejido pancreático del conejillo de Indias (Datos según Siekevitz y Palade)

Pero ¿qué es este retículo endoplásmico? Por años, los citólogos habían observado en el citoplasma de la mayoría de las células, una fina red o malla, demasiado difusa y pequeña como para ser vista claramente con el microscopio de luz.

Cuando comenzó a emplearse el microscopio electrónico para especímenes biológicos, se encontró rápidamente que esa red estaba formada de diversas membranas que encerraban espacios vesiculares, tubulares o planos dentro de la célula, y que estos espacios estaban probablemente interconectados unos con otros. En algunas células, como en las secretoras y en las glandulares, existe una inmensa profusión de estos espacios limitados por membranas; en otras células, como en las musculares, estos espacios han disminuído en número; y aún en otras, como en las bacterias, no existen espacios. Además, en algunos casos, las membranas están cubiertas con pequeñas partículas; en tanto que en otras, están desnudas. Por lo general, podemos describir la parte extramitocondrial del citoplasma tomando en consideración estas estructuras, como sigue:

- (1) células con membranas libres de partículas;
- (2) células con membranas, todas las cuales tienen partículas en su superficie;
- (3) células con membranas con o sin partículas;
- (4) células sin membranas, solamente partículas y

(5) en unos cuantos casos, células con muy pocas membranas y también con muy pocas partículas.

En otras palabras, se puede encontrar toda la gama de posibles combinaciones. Realmente "microsoma" no es un término muy descriptivo, puesto que solamente da idea de los resultados de un método, el de centrifugar a altas velocidades el residuo de la fracción mitocondrial. De esta manera, si una célula tiene membranas con partículas en su citoplasma, entonces, la fracción del microsoma se halla formada de los fragmentos de estas membranas, todavía con partículas sobre ellas. Si la célula tiene solamente partículas, entonces las fracciones del microsoma consisten sólo de partículas; si únicamente de membranas, entonces la fracción del microsoma es una fracción membranosa; y así sucesivamente. Por ejemplo, en las células vesiculosas del páncreas, el citoplasma consiste de vesículas rodeadas de membranas y de espacios, la mayoría de estas membranas cubiertas de partículas en su superficie, aunque algunas están desnudas, como se muestra en la Fig. 13-2. La fracción del microsoma del páncreas está, por lo tanto, compuesta de fragmentos de estas vesículas rodeadas de membrana, algunas con partículas en su superficie. Esto se muestra en la Fig. 13-2. En el hígado, la mitad de estas membranas poseen partículas; de manera que la fracción del microsoma del hígado es notoriamente heterogéneo en su morfología, consistiendo de membranas, de espacios entre estas membranas y de partículas sobre esas membranas. También lo es químicamente, ya que la mayoría, si no todo el fosfolípido se encuentra en las membranas, mientras que la mayor parte del ARN se halla en las partículas. Es heterogéneo bioquímicamente debido a que las membranas tienen varias funciones (véase Cap. 14), mientras que las partículas están íntimamente implicadas en la síntesis de las proteínas. Estas partículas compuestas de ARN y proteínas, se han denominado "**ribosomas**"; su significado para nuestra historia es que parecen ser las estructuras intracelulares que están involucradas en la síntesis de las proteínas celulares.

Parece extraño que hace quince años ningún bioquímico tenía una idea correcta del funcionamiento del ARN. Desde hacia mucho tiempo se había conocido la existencia de estas macromoléculas y aun se sabía que el ARN estaba presente tanto en el núcleo como en el citoplasma, pero principalmente en el último. Por mucho tiempo se había observado que ciertas células, y solamente determinadas partes de ellas, respondían a la tinción con colorantes basófilos; se decía que estas células eran basófilas debido a que contenían grandes cantidades de compuestos ácidos macromoleculares que se combinaban con los colorantes básicos. **Ahora sabemos que es el ARN de estas células es el que se combina con estos colorantes.** Se observó posteriormente que las células que eran basófilas eran precisamente las activas en la síntesis de las proteínas. Esta observación hecha por Brachet fue el primer vislumbre de que el ARN estaba implicado en la síntesis de las proteínas.

Todavía más, son las partículas de la célula las responsables de la basotíña, puesto que es el ARN de los ribosomas, es el que se combina con los colorantes básicos. Por lo tanto, aquellas células basófilas que son muy activas en la síntesis de las proteínas, son precisamente las células que contienen un gran número de partículas, algunas fijas en las membranas y otras flotando libremente en el citoplasma.

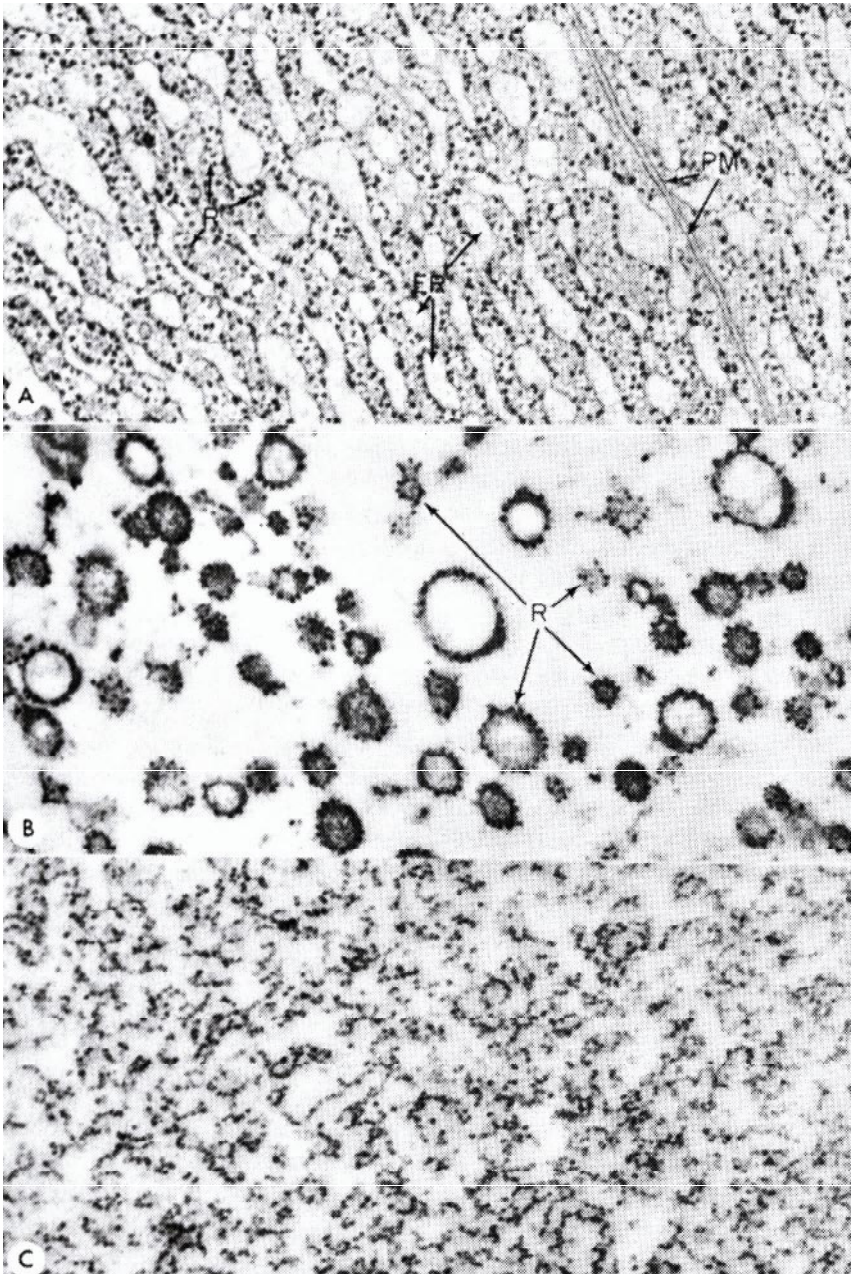


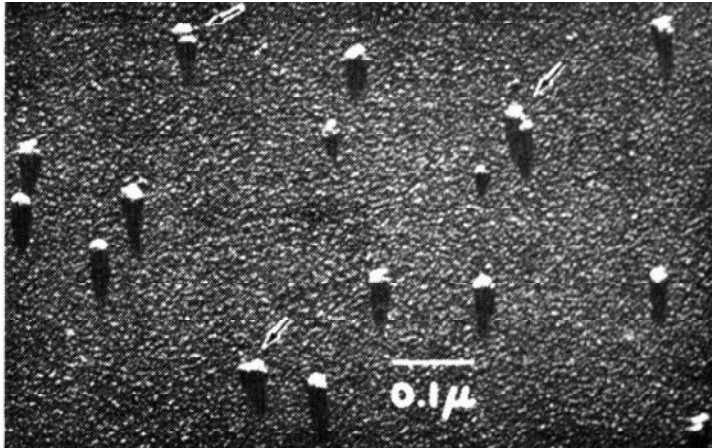
Fig. 13-2.

El retículo endoplásmico y los microsomas.

A; El retículo endoplasmático en la célula acinar pancreática (x 46000)

B: Microsomas aislados de la célula acinar pancreática (x 39000).

C: Ribosomas aislados de las células acinares pancreáticas (x 52000).



D: Ribosomas aislados de la *E. Coli*. Las partículas de 70S están indicadas por medio de flechas y están formadas por una partícula de 50S y una de 30S ($\times 102000$). ER, perfiles del retículo endoplasmático; R, ribosomas; PM, membrana del plasma. (A, B, y C, cortesía de G. Palade, Rockefeller Institute. D, Cortesía de C. E. Hall y H. S. Slayter, Massachusetts Institute of Technology)

Síntesis de las proteínas *in vitro*

Posteriormente se encontró que esta incorporación de los aminoácidos radiactivos dentro de las proteínas podría tener lugar *in vitro* dentro del tubo de ensayo. Se puede hacer un homogeneizado de un tejido activo, por ejemplo hígado, y si los factores apropiados se incuban junto con él, los aminoácidos radiactivos que se añaden se encuentran incorporados en las proteínas del hígado. Existe en realidad, un desdoblamiento neto de las proteínas durante la incubación, pero la presencia de aminoácidos radiactivos hace posible descubrir que se verifica la síntesis de una pequeña cantidad de proteína; es tan pequeña que solamente por el método muy sensible de la radiactividad se pudo descubrir en medio de desdoblamientos mucho más grandes. Se encontró que los agregados más necesarios eran un sustrato oxidable y cofactores para la oxidación. En otras palabras, las condiciones que se encontraron necesarias para la incorporación de aminoácidos radioactivos dentro de las proteínas, fueron precisamente aquellas que se necesitaban para la fosforilación oxidativa para la síntesis del TFA (véase la Tabla 13-1). Este hallazgo fue importante debido a que, por años, se había pensado que el mecanismo para la síntesis de la proteína y para su degradación era el mismo, que la síntesis de ella era justamente lo contrario de su degradación. La principal razón por la cual se creía que éste era el caso, está relacionada con la necesidad de la célula de sintetizar, no precisamente cualquier proteína, sino proteínas específicas.

TABLA 13-1

Capacidad de Varias Fracciones Modológicas Aisladas de Célula de Hígado Para Oxidar Substrato, Formar TFA, e Incorporar Aminoácidos Radiactivos Dentro de sus Proteínas. (Datos Según Siekevitz)

Fracción	Consumo de oxígeno	TFA formado de proteína	Conteos/min/mg
Homogeneizado	37,4	4,0	10,8
Mitocondrios	8,2	4,2	1,3
Microsomas	0,4	0,0	1,1
Sobranante	0,8	0,0	0,4
Mitocondrios más microsomas	14,0	4,1	10,2
Mitocondrios más sobranante	9,7	4,1	1,5
Mitocondrios más microsomas más sobranante	18,8	3,8	4,3
Mitocondrios más microsomas hervidos	9,7	4,4	1,2

También sabemos de la existencia de muchas enzimas proteolíticas que son muy específicas en la hidrolización de enlaces peptídicos solamente entre ciertos aminoácidos. Estas enzimas proteolíticas, como todas las enzimas, podrían, teóricamente, catalizar una reacción reversible; así, hipotéticamente, no sólo podrían degradar proteínas específicas para convertirlas en aminoácidos, sino sintetizarlas a partir de ellos. Pero sabemos actualmente que la síntesis de las proteínas, no es precisamente lo contrario de su desdoblamiento; que **mientras no se requiere energía para hidrolizar una proteína, se necesita para construirla.**

El homogeneizado que ha sido incubado con el substrato, los cofactores y el aminoácido radiactivo, puede ser fraccionado después de varias incubaciones, en sus diferentes fracciones subcelulares. Nuevamente, se encuentra que las proteínas de la fracción del microsoma son las más radioactivas de todas las fracciones celulares (Fig. 13-3); puesto que el aspecto de este experimento in vitro es el mismo que el del experimento in vivo (Fig. 13-1) parece ser verdad que los experimentos in vitro con la fracción de microsoma son algo semejante a un espejo, de lo que sucede dentro de la célula.

Profundizando más se puede obtener la incorporación de los aminoácidos radiactivos dentro de la proteína si existe substrato oxidante mitocondrial en presencia de los factores necesarios de fosforilación y si se encuentran microsomas que contengan ribosomas, más algunos otros factores en el sobranante.

Esto se muestra en la Tabla 13-1, donde se puede observar que tanto los mitocondrios, que abastecen de energía bajo la forma de TFA, como los

microsomas que proporcionan la maquinaria para sintetizar proteínas, son necesarios para que tenga lugar la incorporación: no podrían trabajar independientemente. hicieron posteriormente varias modificaciones sobre este sistema básico.

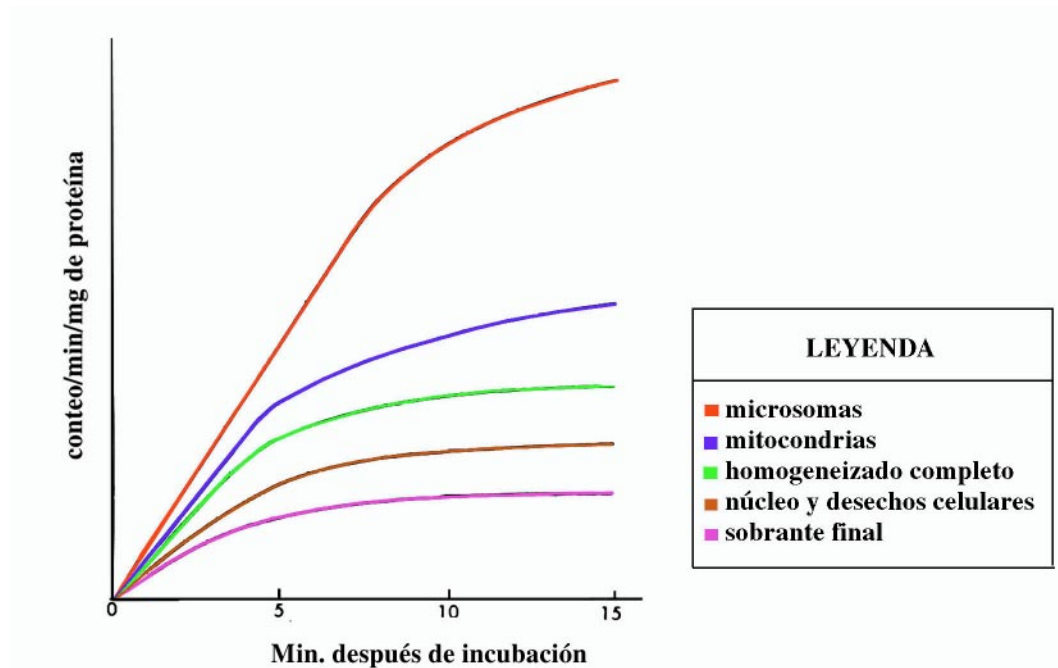


Fig. 13-3. Incorporación in vitro de aminoácidos radiactivos dentro de las proteínas de varias fracciones modológicas de homogeneizado de hígado de rata. (Datos según Siekevitz)

En lugar de los mitocondrios, pueden agregarse DFA, fosfoenolpiruvato y la apropiada enzima quinasa purificada, con el fin de hacer el TFA. En lugar de los microsomas completos, se podía usar una preparación pura de partículas ribosómicas obtenida de la fragmentación de los mismos. En algunos casos, como en las bacterias o en las células reticulocitos, se puede obtener un preparado razonablemente puro de ribosomas, por medio de la homogeneización de las células y la centrifugación diferencial de la suspensión.

En lugar de obtener radioactividad de aminoácidos en una mezcla de proteínas degradadas, podemos aislar, como en el caso de la célula reticulocito, solamente una proteína, la hemoglobina, ya que estas células sintetizan solamente esta proteína heme, transportadora de oxígeno. Por lo tanto, como se puede observar en la Tabla 13-2, podemos fabricar proteínas a partir de ribosomas aislados, una fuente de energía como el fosfoenolpiruvato y la quinasa pirúvica, aminoácidos y varios otros cofactores, como los contenidos en la fracción de "pH 5" en algunos casos, una proteína específica.

Naturaleza de los ribosomas

Debido a la reciente importancia encontrada de los ribosomas, mucho trabajo de investigación se ha efectuado con ellos últimamente.

TABLA 13-2. REQUERIMIENTOS DE LOS RIBOSOMAS AISLADOS PARA LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS RADIATIVOS DENTRO DE LA PROTEINA

El sistema completo consiste de ribosomas de hígado, TFA, TFG, MgCl₂, la fracción de "pH 5" (que contiene la enzima activadora, la enzima transportadora, probablemente otros factores de proteínas y el ARN transmisor) y un sistema generador de TFA (fosfoenolpiruvato, DFA y quinasa pirúvica) y leucina radiactiva. (Datos de Kirsch, Siekevitz y Palade).

Sistema	CPM/mg de proteína
Completo	66
Menos fosfoenolpiruvato y la quinasa pirúvica	7
Menos TFG	3
Menos TFA	3
Menos la fracción "pH 5"	6

Estas partículas son elementos ubicuos que se encuentran en todas las células que sintetizan proteínas, desde las bacterias hasta las células de los órganos de los mamíferos (véase Fig. 13-2). Como ya se mencionó, están algunas veces ligados a elementos membranosos de la célula y en otros casos, quedan libres en el citoplasma. Su disposición en la célula parece no influir en su función; los ribosomas bacterianos, que existen libres en la célula, fabrican proteínas tan bien, o aún mejor, que los ribosomas de las células de los mamíferos. Su tamaño es siempre aproximadamente el mismo de 150 a 200 mμ de diámetro. Su constitución es también la misma, puesto que contienen de 40% a 60% de ARN, siendo el resto proteínas. El ARN es de un peso molecular muy elevado, estimándose ser aproximadamente de 2000000 en varias clases de partículas. No se sabe qué une el ARN a la proteína pero se cree que sea por medio de fuerzas electrostáticas, formando enlaces salinos entre los grupos fosfato del ARN y los grupos amino de los aminoácidos básicos de la proteína, o complejos de magnesio entre la misma clase de grupos, o quizás una combinación de ambos. El ARN se puede extraer de la proteína por medio de agentes que rompan precisamente tales enlaces, como soluciones salinas concentradas, o reactivos complejos de magnesio.

La estructura ribosomática y su apariencia dependen estrechamente de la presencia y de la cantidad de magnesio. En ausencia de este elemento en el medio, las partículas más grandes se separan para presentar una nueva familia de partículas más pequeñas, cada una de las cuales tiene la misma proporción entre ARN y proteína que en las partículas originales. Los ribosomas bacterianos probablemente existen en la célula como partículas de 100 S o de 70 S (S = unidad Svedberg), pero se pueden romper para originar partículas más pequeñas de 50 S a 30 S. Los ribosomas de las levaduras y los de las células de los mamíferos, existen probablemente como partículas de 120 S y de 80 S y se pueden romper en partículas de 60 y de 40 S. No se sabe cómo estas partículas más pequeñas se unen para formar a las más grandes pero se cree que en ello están implicados los complejos del Mg^{+2} . No se sabe, definitivamente, cuáles de estas partículas o subpartículas son las activas en la síntesis de la proteína; las investigaciones indican que de alguna manera las más pequeñas se acoplan para formar a las más grandes y que son estas últimas las más activas para sintetizar a las proteínas. Hay también algunos indicios de que solamente una pequeña porción de estas partículas dentro de la célula, sintetiza proteínas en cualquier momento; no se sabe lo que le impide al resto de ellas hacerlo. Las proteínas de los ribosomas parecen ser básicas en su naturaleza, más o menos de la misma clase que las que unen al ADN en los núcleos de las células de los mamíferos. Se desconoce la naturaleza del ARN, pero se cree que actúa, junto con el ARN "mensajero" que se mencionará posteriormente, como un patrón para la síntesis de las proteínas específicas. No sabemos dónde es sintetizado, aunque se supone que el lugar está en el núcleo (véase Cap. 12); todo lo que conocemos es que el ARN ribosomático no presenta ninguna transformación. En otras palabras, parece que, una vez que se ha formado, es estable y no se desdobra durante toda la vida de la célula. De esta manera, el ARN ribosomático se comporta como el ADN genético, en ser estable metabólicamente.

Mecanismo de la síntesis de la proteína

¿Cuáles son los otros factores necesarios para que tenga lugar la síntesis de la proteína? Para contestar esta pregunta debemos penetrar con algún detalle, en lo que se sabe acerca del mecanismo de la síntesis de la proteína. Hace algunos años, **Lipmann** presentó la idea de que, en la preparación para su papel en la síntesis de la proteína, los diferentes aminoácidos deben ser llevados a un estado de "elevada energía". Se formuló además la hipótesis de que esto podía verificarse solamente con la intervención del TFA. En búsqueda de una reacción tal, **M. Hoagland** descubrió las enzimas activadoras de aminoácidos. El TFA reacciona con un aminoácido individual, en presencia de esta enzima, para separar al pirofosfato inorgánico y formar un compuesto aminoaciladenilato (Fig. 13-4). Este compuesto

permanece íntimamente ligado a la enzima. Existen enzimas específicas que catalizan la reacción para cada aminoácido individual. El carácter de elevada energía del compuesto aminoaciladenilato está indicado por la observación de que al incubar una enzima con el aminoácido, el TFA y el pirofosfato inorgánico radiactivo, hay una radiactividad en el TFA que se puede aislar. Así, la reacción es fácilmente reversible mostrando que el contenido de energía del enlace acetilo en el aminoacetiladenilato es aproximadamente la misma que la del enlace del penúltimo pirofosfato del TFA.

El aminoácido ha sido "activado".

La hipótesis del siguiente paso en la síntesis de proteína fue en realidad presentada por **Crick** antes de que fuera descubierta. El razonamiento era de que si los ribosomas estaban implicados en la síntesis de la proteína, por contener ARN informativo o molde, debería haber un transportador del aminoácido activado a los ribosomas; este transportador debería obrar de tal manera, como para ser capaz de "reconocer" al ARN de los ribosomas. En ese entonces se postuló, que este ARN de los ribosomas tenía la información para hacer una proteína específica y qué otra molécula excepto otra molécula de ARN, era más conveniente para desempeñar este papel? El siguiente paso (Fig.13-4) consiste en el transporte del aminoácido, de su enlace acilo en la mitad del adenilato al extremo de cierto tipo de molécula de ARN, la llamada soluble, o ARN transporte. Este paso está catalizado por la misma enzima específica activadora de aminoácidos y en el proceso se libera FAM del aminoaciladenilato.

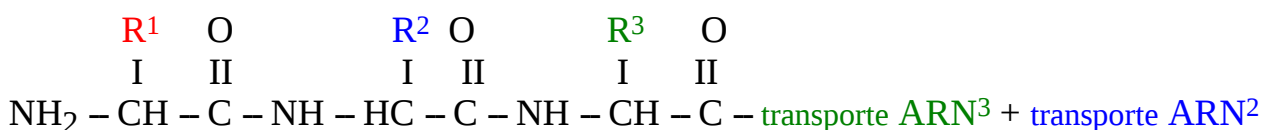
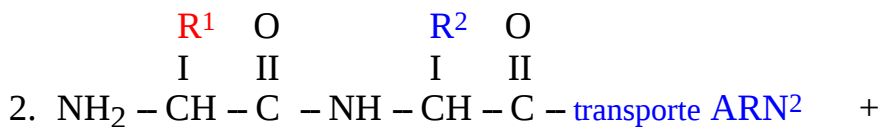
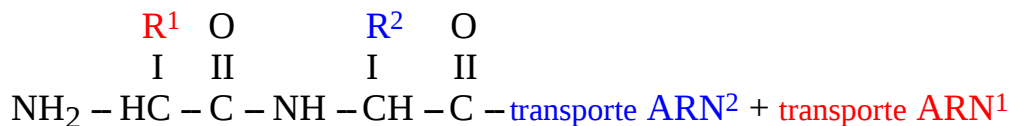
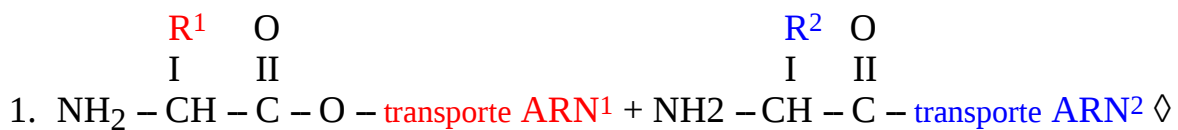
Existen moléculas específicas de ARN para cada uno de los aminoácidos, tal como hay enzimas activadoras específicas. De manera que podemos decir que, para cada aminoácido se encuentra una enzima activadora específica y una molécula transportadora de ARN también específica. Cada una de estas moléculas de ARN transporte es mucho más pequeña que el ARN de los ribosomas, pero aún es una molécula relativamente grande, siendo aproximadamente de 23000 su peso molecular, y poseyendo de 70 a 80 nucleótidos en su cadena. Los tres últimos nucleótidos (citidílicocitidilicoadenílico) son los mismos en cada uno de los ARN transporte de aminoácidos específicos.

En el transporte desde el aminoaciladenilato, el aminoácido se une en la mitad de la rubosa del ácido adenílico terminal, para formar un enlace éster. Otra vez la reacción parece ser reversible, por lo cual debemos suponer que este enlace éster es de una naturaleza de elevada energía. Este es el único caso conocido, en donde un enlace éster está en equilibrio con un enlace pirofosfato del TFA; no se sabe al presente, la razón por la cual se verifica esto. Sin embargo, si los tres nucleótidos terminales de los diferentes ARN transportes son los mismos, entonces para explicar la especificidad del ARN, debemos suponer que en el resto de la cadena del ARN hay ciertos arreglos de los nucleótidos para que se verifique la

individual del ARN transporte. De esta manera, el ARN transporte actúa, no solamente como un portador, sino como un portador específico "segurísimo".

El siguiente paso o pasos en la síntesis de la proteína (Fig. 13-4) son los más desconcertantes. Podemos efectuar experimentos *in vitro* en tubos de ensayo en los cuales el aminoácido radiactivo se encuentra unido a su ARN transporte específico; si se añaden ribosomas y ciertos factores, el resultado es una proteína radioactiva ligada a la superficie de los ribosomas. Necesitamos como cofactores a otro compuesto de elevada energía, el TFG, y dos proteínas solubles. Una de las últimas probablemente es la enzima formadora de enlaces peptídicos; lo que es la otra y lo que hace el TFG, es un misterio. Además, parece haber un paso preciso para sacar la proteína terminada de los ribosomas y llevarla al medio, o quizás dentro de la parte soluble de la matriz celular; de nuevo se desconoce la naturaleza exacta de este paso.

Según las investigaciones de **Dintzis** y **Schweet**, sabemos que en el sistema de ribosomas del reticulocito que sintetiza a la hemoglobina y probablemente en la síntesis de todas las proteínas la cadena proteica de la molécula de la hemoglobina es sintetizada en una forma lineal, partiendo del grupo amino no libre del extremo de la molécula; la reacción probablemente se efectúa como sigue:



3. n veces

Es interesante que estos resultados sobre la linealidad de la síntesis de la proteína están de acuerdo con los resultados del trabajo sobre el código genético. Desearíamos conocer más acerca de esta reacción, incluyendo lo que se refiere al destino de las moléculas del ARN transporte, así como también a las fuerzas que sostienen a los primeros aminoácidos dentro del patrón y también por qué el grupo amino es el grupo reactivo en la formación del enlace peptídico, puesto que el aminoácido está "activado" en su carboxilo terminal. El último aspecto del mecanismo de la reacción es similar a la que tiene lugar en la activación del ácido graso en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga, porque aquí también el carboxilo terminal está activado, pero la reacción se verifica en el otro extremo de la molécula, el metileno.

Síntesis de la proteína específica

La estabilidad del ARN ribosómico, desde el punto de vista genético, muestra una nueva paradoja. Si el ADN es la clave genética en el núcleo y los ribosomas constituyen la maquinaria sintetizadora de proteínas en el citoplasma, entonces debe ser el ARN ribosómico el que posea la información genética proveniente del ADN que traduzca la copia en algo más concreto. El hallazgo de las enzimas que sintetizan el ARN en presencia del ADN y cuyo ARN tiene las mismas proporciones de bases que el ADN, sirven para sostener este argumento (véase el Cap. 12). En las bacterias, la síntesis de algunas nuevas proteínas en este caso, nuevas enzimas puede ser inducida por la adición de substrato al medio de cultivo; los detalles de la síntesis de enzimas inducida se proporcionan en Vida Bacteriana, de esta serie. La síntesis de una nueva proteína comienza inmediatamente después de la adición de substrato, como se puede medir muy fácilmente ya que la nueva proteína es una enzima, y esta síntesis cesa inmediatamente después de que las células bacterianas son lavadas para liberarlas del substrato. Asimismo, cuando las bacterias están infectadas de virus bacterianos, o bacteriófagos, las células bacterianas comienzan rápidamente a fabricar nuevas enzimas necesarias para la nueva síntesis de constituyentes víricos específicos. En el primer caso, la adición de substrato origina que, de alguna forma, la célula fabrique nueva proteína; en el último caso, el ADN del fago es el agente predeterminante. Sin embargo, en ninguno de los dos casos, parece ser que haya algún cambio del ARN ribosómico bacteriano; éste es estable. Aún más, si hemos postulado que el ARN ribosómico es el que tiene la información necesaria para fabricar proteína específica, ¿cómo es posible que, cuando la célula es inducida a hacer nueva proteína, no hay todavía ningún cambio perceptible en el ARN ribosómico?

Enfrentándose con este problema, varios investigadores, dirigidos por **Jacob y Monod**, han llegado a la conclusión de que existe un **ARN "mensajero"** (véase el Cap. 12). De acuerdo con esta hipótesis, hay una molécula de ARN que es sintetizada en el núcleo, o en la región nuclear en el caso de las bacterias, quizás por las mismas enzimas que utilizan los trifosfatos y el ADN; este "mensajero" se dirige al citoplasma, se enlaza con los ribosomas y dirige a éstos ya dentro de la célula, a fabricar la proteína específica. De acuerdo con este punto de vista, los ribosomas constituyen una maquinaria sintetizadora de proteínas no específicas. En el segundo caso citado anteriormente, es el ADN de la partícula fago infectante, el que se pensó era la fuerza directriz en la síntesis del "mensajero". Se ha encontrado que, cuando una célula bacteriana se infecta con un fago que contiene ADN, un pequeñísimo porcentaje del ARN propio de la célula bacteriana, sufre un rápido cambio, se sintetiza y se desdobra muy rápidamente. Además, si se determinan las proporciones de las bases de este ARN en cierta forma se llega a la conclusión de que tiene la misma composición que el ADN del virus infectante. Este tipo de ARN es probablemente un compuesto de moléculas de ARN de diversos tamaños; aparentemente terminando todas ellas unidas a los ribosomas preexistentes de la bacteria. Por consiguiente, como ya se mencionó en el Cap. 12, parece que hay cierta evidencia experimental de la existencia de una molécula de ARN, o una serie de ellas, que poseen las propiedades que se le han asignado al ARN "mensajero".

Sin embargo, como en todos los subcampos de la ciencia de rápida expansión, existe también alguna evidencia contra esta idea, o al menos contra la más bien ingenua idea propuesta anteriormente. Por ejemplo, los ribosomas procedentes de las células reticulocitos - células que son las precursoras de los glóbulos rojos y que carecen de ADN- tienen la capacidad de sintetizar hemoglobina: por lo tanto que el ADN fabrique ARN mensajero para que actúe como patrón para la síntesis de una proteína específica. Esta discrepancia puede obviarse, hipotéticamente, por la aserción de que las células bacterianas, al duplicar su número cada 20 o 30 minutos y siendo muy sensibles a los cambios en el medio ambiente, tienen la necesidad de un mensajero inestable. Las células de un organismo pluricelular por el contrario, tienen mucho más tiempo para duplicarse y no necesitan ser sensibles a los cambios del medio ambiente, puesto que el suyo es un abastecimiento de sangre bastante estable; por lo tanto, ellas realmente no tienen necesidad de un mensajero inestable y este "mensajero" permanece unido a los ribosomas todo el tiempo que viva la célula. Algunos investigadores, particularmente **Roberts**, han sostenido que en realidad, lo que sucede cuando las bacterias son infectadas por virus, no es la síntesis de nuevas moléculas "mensajeras" que posteriormente se enlacen a los ribosomas preexistentes, sino la síntesis de un pequeño número de nuevos ribosomas con el llamado mensajero, que es en realidad el ARN de estos

nuevas ribosomas. Ciertamente, en el momento actual el panorama no está muy claro.

Sin duda alguna existe una fracción de ARN celular que cambia mucho bajo ciertas condiciones y, al parecer, tiene las proporciones de bases del ADN pertinente; recientemente se ha descubierto una fracción como ésta en los núcleos de las células del timo y en los núcleos de las células regeneradoras del hígado. Sus relaciones con el ARN ribosómico no están claras; sin embargo, algunos investigadores la consideran ser, en parte, una precursora del ARN ribosómico; otros la ven como el mismo ARN ribosómico, no siendo un portador codificado genéticamente, sino solamente como poseyendo un papel estructural capaz de enlazar al ARN "mensajero" a sí misma.

Aún más, existe un dogma en biología hasta el momento actual, incapaz de probarse, y es que el ADN de todas las células somáticas de los organismos pluricelulares es el mismo. Si esto es así y si la información genética reside solamente en la secuencia de bases del ADN, entonces la información genética es la misma en todas las células somáticas. Pero sabemos de hecho, que las células de un órgano o de un tejido son diferentes entre sí; por algún motivo, poseen diferentes enzimas, y, por lo tanto, transmiten información diferente en cada caso para indicar que una célula es por ejemplo del hígado y no una célula muscular del corazón. Si la información genética del ADN es la misma, tiene que haber un intermediario en la cadena entre el ADN nuclear y la maquinaria citoplasmática sintetizadora, que no es el ARN "mensajero" y que no es una mera réplica del ADN. Este intermediario hipotético podría ser una substracción diferencial o un enmascaramiento también diferencial del ADN de una célula a otra. Se ha postulado que la histona, que se encuentra formando un complejo con el ADN en el núcleo, actúa como un agente enmascarador, en donde el ADN "desnudo" reacciona como un patrón para la síntesis del ARN. Estas razones son las que originan duda sobre la hipótesis de que existe una relación lineal sencilla entre la información genética del ADN y el receptor de esta información en los ribosomas citoplasmáticos. Debería hacerse mención de que el núcleo parece tener también partículas semejantes a ribosomas y por la cantidad limitada de trabajo efectuado por estas partículas, parece que éstas también son capaces de sintetizar proteínas.

"Código" del ácido nucleico

Hemos estado hablando de la información genética del ADN, siendo precisamente esta información la necesaria para la síntesis de las proteínas específicas. Podemos decir que en el ADN se encuentra una serie de nucleótidos, lo que significa que cierto aminoácido puede ser colocado en determinado lugar en

una proteína durante la síntesis de la misma; en otras palabras, la colocación de los nucleótidos en el ADN puede ser un código para el arreglo de los aminoácidos en una proteína. Hasta 1962, los biólogos en general tenían pocas esperanzas aun en "descifrar" este "código". Sin embargo, físicos como **Gamow** y fisicoquímicos como **Crick** comenzaron a emitir postulados matemáticos para determinar a qué clase de códigos teóricos posibles podían relacionarse los cuatro nucleótidos diferentes del ADN, o del ARN, con los 20 aminoácidos diferentes de las proteínas. Hasta ahora el código más aceptado es el obtenido por Crick y Brenner, en el cual una "palabra" de tres "letras", o nucleótidos, arreglada en cierta secuencia significa determinado aminoácido. Existe cierta base experimental y teórica para dicho código. Se cree que este código no es sobrepuesto, es decir, que el código lee linealmente a lo largo del ADN, o a lo largo del ARN "mensajero" y, por lo tanto, cualquier nucleótido a lo largo de la cadena del ácido nucleico puede ser parte solamente de una "palabra de tres letras".

Se piensa ahora que este código puede romperse del siguiente modo. Ha sido posible aislar enzimas bacterianas que sintetizan ARN a partir de los difosfatos de nucleótido añadidos. **La enzima no es específica, puesto que puede sintetizar cualquier clase de molécula de polinucleótido, dependiendo esta molécula de la clase de nucleótido que se añada a la mezcla en incubación.** Por ejemplo, si se añaden difosfatos de uridina, las enzimas fabricarán un ácido poliuridílico; es decir, moléculas de ácido uridílico unidas unas con otras por medio de enlaces 3'5'-fosfodiéster. No sabemos qué función desempeña esta enzima en la bacteria, ni qué función verifica el ARN en la economía de la célula. No obstante, se ha encontrado que los productos de las reacciones enzimáticas son muy útiles, porque en la actualidad, podemos fabricar muchas clases de moléculas específicas parecidas al ARN, prácticamente de la composición específica que se quiera, simplemente variando los difosfatos de nucleótido que se añaden como precursores al medio en incubación que contiene la enzima útil. De esta manera, además del ácido poliuridílico, se pueden fabricar otros polinucleótidos conteniendo ácidos adenílico, guanílico y citidílico, en diversas y conocidas proporciones

Uno de estos polímeros, el ácido poliuridílico, fue primeramente empleado por **Nirenberg** en un sistema de incorporación *in vitro* de aminoácido radiactivo conteniendo ribosomas de E. Coli y los cofactores apropiados para que se efectúe la incorporación del aminoácido. Cuando se emplearon varios aminoácidos radiactivos, se encontró que solamente en el caso de la fenilalanina había un gran aumento en la incorporación del aminoácido dentro de la proteína en presencia del ácido poliuridílico. En esta forma, este ácido actuaba como un ARN "mensajero". Igualmente, cuando se añaden al sistema otros polirribonucleótidos fabricados sintéticamente, se encuentra que otros aminoácidos son incorporados específicamente dentro de la proteína. Este fue por primera vez, un instrumento con

el cual los nucleótidos podían relacionarse experimentalmente a los aminoácidos. Los resultados de emplear polímeros diferentes conteniendo proporciones diversas de los cuatro nucleótidos diferentes y utilizando todos los 20 aminoácidos como precursores radiactivos en experimentos individuales pueden expresarse en una tabla; de ella se puede sacar la conclusión que ciertas combinaciones de nucleótidos parecen ser los ingredientes necesarios para la incorporación de los aminoácidos radiactivos particulares dentro de las proteínas de los ribosomas de la E. Coli. Si tres nucleótidos en fila "pretenden ser" o "significan un determinado aminoácido, podemos decir, por lo tanto, que tres ácidos uridilicos en fila "significan" fenilalanina.

La Tabla 13-3, que es una compilación de los resultados obtenidos en los laboratorios de **Ochoa** y **Nirenberg**, nos muestra que cierta combinación de nucleótidos significa los varios aminoácidos. El orden de los nucleótidos individuales en cada terceto es de importancia, pero hasta la fecha no se conoce.

Algunos aminoácidos tienen más de una palabra código, como puede verse en la tabla, pero lo que esto significa, todavía no se sabe. La presente suposición, basada también en otras formas de evidencia, es que el código completo puede degenerar; es decir, que un solo aminoácido puede ser especificado por más de un conjunto de nucleótidos. Esta redundancia reducida la oportunidad de error en la traducción del código de ácido nucleico a proteína.

No se conoce el orden de las letras individuales en las palabras código, pero los investigadores han hecho algunas suposiciones. La evidencia independiente ha verificado algunas de estas palabras código para ciertos aminoácidos. Por ejemplo, se pueden producir, por medios químicos, mutantes del virus del mosaico del tabaco por medio de la desaminación del ARN del virus con ácido nitroso, cambiando de esta forma la citidina del ARN en uridina, y la adenina en guanina. En la capa de proteína resultante en estos virus mutantes, se puede observar que se han alterado algunos de los aminoácidos de la proteína; algunos aminoácidos han sido reemplazados por otros en ciertos lugares de la cadena proteica tal vez como resultado de la mutación causada por el tratamiento del ARN con el ácido nitroso. Conociendo qué clase de cambios se producen en el ARN por el ácido nitroso e igualmente qué aminoácidos son reemplazados por otros, podemos hacer una correlación entre ambos hechos. La Tabla 13-4 nos indica esta correlación.

Compare las Tablas 13-3 y 13-4 y observe la marcada similitud entre los códigos obtenidos por los dos métodos diferentes.

Armados de este código, los investigadores pueden hacer predicciones acerca de qué nucleótidos en una combinación codificada para determinado aminoácido puede ser cambiado por otro nucleótido codificado para otro aminoácido. Por ejemplo, pueden aislarse diferentes clases de moléculas de hemoglobina de los organismos humanos que padecen enfermedades caracterizadas por cambios específicos en las proteínas de la hemoglobina de las células de los glóbulos rojos.

Se puede determinar qué aminoácidos de estas proteínas difieren de sus congéneros en moléculas de hemoglobina normal; de esta manera, en algunos casos, un ácido glutámico, que está en cierta posición en la hemoglobina normal, se ha cambiado a una molécula de glicina en esa misma posición.

TABLA 13-3

RELACIONES DE LAS COMBINACIONES DE NUCLEOTIDOS EN LA INCORPORACION DE AMINOACIDOS DENTRO DE LA PROTEINA

(Datos de Nixenberg y Ochoa)

Nucleótidos en los tercetos postulados	Aminoácidos incorporados
3 ácidos uridílicos	fenilalanina
2 ácidos uridílicos, 1 adenílico	isoleucina, leucina, tirosina
2 ácidos uridílicos, 1 citidílico	isoleucina, leucina, tirosina
2 ácidos uridílicos, 1 guanílico	leucina, serina
1 uridílico, 2 adenílicos	valina, cisteína, leucina
1 uridílico, 2 citidílicos	asparagina, lisina
1 uridílico, 2 guanílicos	prolina
1 uridílico, 1 adenílico, 1 citidílico	triptofano, glicina
1 uridílico, 1 adenílico, 1 guanidílico	treonina, histidina, asparagina metionina, ácido glutámico, ácido aspártico
1 uridílico, 1 citidílico, 1 guanidílico	glutamina, alanina, arginina

Se predijo entonces que esos reemplazamientos de aminoácidos podrían deberse a cambios en los nucleótidos individuales en la palabra código de tres letras para determinados aminoácidos (véase la Tabla 13-5). En otras palabras, pueden predecirse los más comunes reemplazamientos de aminoácidos, simplemente sobre la base de la frecuencia probable de los cambios de un nucleótido en un código cambiante de tres nucleótidos individuales, en la palabra código de tres letras para determinados aminoácidos (véase la Tabla 13-5). En otras palabras, pueden predecirse los más comunes reemplazamientos de aminoácidos, simplemente sobre la base de la frecuencia probable de los cambios de un nucleótido en un código cambiante de tres nucleótidos, por ejemplo, ácidos uridilicoadenilicoguanilico a ácidos uridilico citidilico guanilico. Parece que ha sido descubierto un código en

que las secuencias simples de la molécula del ADN pueden, probablemente a través de un ARN intermediario, codificarse para la ubicación de los aminoácidos específicos en lugares determinados de una proteína.

Sin embargo, una vez más, todavía no se sabe si éste es en realidad un verdadero código, un espejo de algo mucho más complicado y misterioso; o si existe más de un código en que las combinaciones de nucleótidos diferentes se codifiquen para el mismo aminoácido.

TABLA 13-4

EJEMPLOS DE CONCORDANCIA ENTRE LAS SUSTITUCIONES DE AMINOACIDOS EN LAS PROTEINAS DE MUTANTES DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL TABACO Y LAS PALABRAS CODIGO DE LOS NUCLEOTIDOS, DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE

Las mutantes del virus del mosaico del tabaco fueron obtenidas tratando el virus con ácido nitroso, que cambia la base citosina del ARN a uracilo y la base adenina a guanina,

Código postulado	→ {	Asparagina HAC	Acido aspártico UAG	Leucina CUU	Prolina CCU
Cambios producidos por el ácido nitroso	→	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓
Código postulado	→	UGC Alanina	LIGG Glicina	UUU Fenilalanina	CUU Leucina

Los investigadores que trabajan en este campo en particular han alcanzado el punto experimental al tomar los ribosomas de la E. coli, añadir los cofactores necesarios para la incorporación de los aminoácidos radiactivos dentro de las proteínas, adicionar determinada clase de ARN y obtener la síntesis de una proteína específica. Si al virus del mosaico del tabaco se le agrega ARN, parece que se forma la proteína del virus del mosaico del tabaco; si a determinado fago se le añade ARN, parece que se sintetiza determinada proteína del fago. No se sabe hasta ahora, qué hacen los ribosomas de la E. Coli; específicamente, qué papel representa el ARN ribosomático en estas síntesis. Quizás simplemente actúe como una forma estructural de los ribosomas, sobre la cual se construyen las grandes moléculas de las proteínas; o que pueda modificar al ARN "mensajero" en determinada forma

que los ribosomas del hígado, por ejemplo, no hagan junto con el "mensajero" universal del ADN universal de todas las células del organismo una proteína universal, sino específicamente proteínas de la célula del hígado.

TABLA 13-5

EJEMPLOS DE CONCORDANCIA ENTRE LAS SUSTITUCIONES DE AMINOACIDOS DE VARIAS MOLECULAS DE HEMOGLOBINA ESPECIFICA DE DIVERSAS FUENTES Y LAS PALABRAS CODIGO DE LOS NUCLEOTIDOS, DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE

Sustituciones de Aminoácido	Lisina ↓	Histidina ↓	Acido glutámico ↓	Acido glutámico ↓	Histidina ↓
	Acido	Arginina	Glicina	Lisina	Tirosina
	UAA	UAC	UAG	UAG	UAC
Cambio postulado en las palabras del código	↓	↓	↓	↓	↓
	UAG	UGC	UGG	UAA	UAU

Síntesis de proteínas de estructura específica

Hasta aquí nuestra discusión se ha concretado a la secuencia de aminoácidos en las proteínas como determinante de la estructura de las mismas; en realidad, una proteína es una estructura tridimensional con configuraciones específicas. Esta configuración es muy importante debido a que algunas de las propiedades de las proteínas que actúan como enzimas se deben, no solamente a la secuencia de aminoácidos, sino también, a la forma como está plegada la proteína, plegamiento que sirve para acomodar el sustrato de la acción enzimática. Actualmente se cree que, una vez que una proteína tiene una secuencia de aminoácido específica, se plegará naturalmente en una configuración particular y que esto dependerá, más o

menos específicamente, de la distribución y conjunción de los residuos de cisteína en la proteína para proporcionar enlaces bisulfuro.

Son estos enlaces, juntos con los enlaces hidrofóbicos los que se consideran como más importantes para conservar la proteína en una forma tridimensional continua. Se piensa que una vez que se ha sintetizado una proteína específica, se plegará entonces naturalmente en su forma correcta, más aún, no solamente la célula debe sintetizar una proteína específica que tenga propiedades particulares, sino que ésta tiene un lugar predestinado dentro de la célula. La oxidasa citocromo, por ejemplo, es una proteína mitocondrial. Se desconoce completamente cómo esta enzima está colocada finalmente en su posición correcta en la célula.

RESUMEN

Para recapitular, la Fig. 13-5 muestra nuestras ideas actuales sobre la síntesis de las proteínas específicas, como se han descrito en éste y en el capítulo anterior. Una o ambas espirales del ADN actúa como un modelo para la síntesis de posiblemente todo el ARN de la célula, probablemente en el núcleo.

Una parte de este ARN es "mensajero", otra es ribosomática y, probablemente, otra parte es ARN transporte. Existen indicaciones de que el ARN ribosomático es sintetizado junto con el ADN asociado al nucléolo. Todas estas especies de ARN probablemente se mueven entonces en el citoplasma, quedando posiblemente una parte atrás para actuar en la síntesis de la proteína nuclear. El ARN informativo forma parte ya sea de los ribosomas o queda unido a un ribosoma ya formado; los investigadores, hasta el presente, no han podido distinguir entre estas dos alternativas. Tampoco se sabe si el ARN ribosomático toma su proteína en el núcleo o si el ribosoma completo se forma en el citoplasma. Sin embargo, el ribosoma, con su ARN mensajero componente o agregado, se ha convertido en un modelo para la síntesis de las proteínas específicas. Entre tanto, los aminoácidos se han activado y enseguida se han unido a su propio ARN transporte específico. El ejemplo dado en la figura es la fenilalanina; puesto que la palabra clave para la fenilalanina se considera que es tres ácidos uridílicos (UUU), se supone que el ARN transporte tiene una región que "dice" fenilalanina, y que esta región es tres ácidos adenílicos (AAA), región complementaria a la región UUU en el ARN mensajero. El aminoácido está ahora así alineado en su posición correcta, de acuerdo con la clave para la proteína específica que está contenida en el ARN mensajero.

Asentado esto, la enzima que forma el enlace peptídico engancha a este aminoácido con sus aminoácidos adyacentes. Parece que más de una enzima está implicada en este paso final; la que hace que el TFG sea también un enigma.

La configuración final tridimensional de la proteína sintetizada está probablemente determinada por la secuencia de aminoácidos; podemos decir que la estructura primaria de la proteína, su secuencia de aminoácidos, es directamente responsable de su estructura secundaria. En este momento, funciona algún mecanismo libertador desconocido que extrae a la proteína de su modelo. No se sabe con certeza, qué ocurre con el ARN mensajero, y con el ARN transporte. En las bacterias, parece ser que la vida del ARN mensajero es muy corta, durando solamente el tiempo necesario para la síntesis de unas cuantas proteínas; en las células de los mamíferos, parece ser que es un poco mayor, posiblemente dura toda la vida de la célula. Igualmente no sabemos nada acerca del ARN transporte, aunque aquí parece que los tres nucleótidos finales (CCA) deben ser cambiados cada vez que el ARN actúa como un transportador de aminoácido. Asimismo, no se conoce la duración de los ribosomas aunque se cree que permanecen durante toda la vida de la célula, deducción que se ha obtenido de los datos proporcionados por el ARN ribosómico.

Aunque está claro que existen muchas fallas en este esquema, creemos que lo que tenemos aquí es al menos una imagen de la verdad. Para terminar el cuadro, tenemos las herramientas de la genética para complementar nuestro conocimiento bioquímico. Por supuesto, aunque resolviéramos los misterios de cómo la célula puede continuar infaliblemente la síntesis de sus propias proteínas específicas, nos quedaríamos todavía con el problema tan importante de cómo se forma la estructura celular (véase el Cap. 16). Estos problemas incluyen la formación de las estructuras subcelulares, la formación de la estructura celular que es característica para determinado tejido u órgano y los factores que determinan la forma y el tamaño de los órganos individuales y aun del organismo completo.

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

- Allfrey, V. G., and Mirsky, A. E., "How cells make molecules," *Scientific American*, September 1961.
- Brachet, J., 1960. *The biological role of ribonucleic acids*. New York: Elsevier.
- Campbell, P. N., "Synthesis of proteins by cytoplasmic components of animal cells," *Biological Reviews*, Vol. 35 (1960), p. 413.
- Chantrenne, H., 1961. *Biosynthesis of proteins*. New York: Pergamon Press.
- Gros, F., "Biosynthesis of proteins in intact bacterial cells." In Chargaff, E., and Davidson, J. N. (eds.), 1960. *Nucleic acids*. New York: Academic Press. Vol. 3, p. 409.
- Hoagland, M. B., "Relationships of nucleic acid and protein synthesis as revealed by studies in cell-free systems." In Chargaff, E., and Davidson, J. N. (eds.), 1960. *Nucleic acids*. New York: Academic Press. Vol. 3, p. 349.,
- "Nucleic acids and proteins," *Scientific American*, December 1959.
- Hultin, T., "On the function of the endoplasmic reticulum," *Biochemical Pharmacology*, Vol. 5 (1961), p. 359.
- Ingram, V. M., "How do genes act?" *Scientific American*, January 1958.
- McQuillen, K., "Ribosomes and synthesis of proteins," *Progress in Biophysics and Biochemistry*, Vol. 12 (1962), p. 69.
- Palade, G.E., "A small particulate component of the cytoplasm," *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, Vol. 1 (1955), p. 59.
- Porter, K. R., "The ground substance: observations from electron microscopy." In Brachet, J., and Mirsky, A. E. (eds.), 1961. *The cell*. New York: Academic Press. Vol. 2, p. 621.
- Roberts, R. R. (ed.), 1958. *Microsomal particles and protein synthesis*. New York: Pergamon Press.
- Siekevitz, Philip, "The cytological basis of protein synthesis," *Experimental Cell Research*, Supplement 7, (1959), p. 90.
- Zamecnik, P. C., "The microsome," *Scientific American*, March 1958.

CAPITULO CATORCE

LA SUSTANCIA FUNDAMENTAL Y LA CONVERSION DE LA ENERGIA QUIMICA EN TRABAJO

La conversión de la energía química en trabajo mecánico es una propiedad universal de todas las células. En el organismo animal pluricelular y quizás también en los animales unicelulares, los protozoarios, gran cantidad de energía producida bajo la forma de TFA, es consumida por el movimiento propio del animal. En el primer caso, esto significa que el TFA es utilizado, principalmente, para el movimiento del músculo. Excluyendo el agua, la sustancia que en mayor cantidad se encuentra en nuestro organismo, es la proteína muscular. Aproximadamente la quinta parte en peso de nuestro cuerpo es materia sólida; el 80% o más de esta materia es proteína; la mayor parte de ésta se encuentra en las células musculares de nuestro cuerpo. La importancia de la producción de TFA para el movimiento muscular es así aparente. Existen tres grandes problemas concernientes a la fisiología de la célula muscular: uno, es el conocer los componentes celulares que realmente ejecutan el trabajo; otro, es el continuo abastecimiento de energía que se necesita; y el tercero, determinar cómo la energía química es convertida en energía mecánica.

COMPONENTES MACROMOLECULARES

El primer trabajo llevado a cabo experimentalmente fue encontrar qué elementos mecánicos se encuentran en la célula. Las células musculares se caracterizan en que, además de un núcleo y de numerosos mitocondrios, contienen muchas fibras alargadas de proteína que forman la mayor parte de la célula; estas fibras parecen

constituir la clave para la solución de este problema en particular. El bioquímico nunca se siente más feliz que cuando logra desarmar algo y observa qué es lo que hace que esas partes trabajen acompasadamente; si es sagaz y afortunado, puede efectuar una reconstrucción en un tubo de ensayo y en su mente de cómo estas partes separadas se acoplan en un conjunto biológico. Afortunadamente, el tejido muscular se puede desarmar fácilmente. Hace años, **Szent, Györgyi, Bailey, Edsall** y **Engelhardt** comenzaron a fraccionar células musculares, y los bioquímicos han seguido su ejemplo desde entonces. Szent, Györgyi encontró en aquel tiempo, que una proteína muscular particular a la que llamó miosina, podía ser extraída del tejido muscular por medio de soluciones salinas fuertes; la miosina constituye aproximadamente el 55% de las proteínas de la célula muscular. La solución viscosa resultante tenía una elevada doble refracción de flujo, indicando que las moléculas de la proteína en la solución, existían como moléculas muy alargadas. Cuando se añadía TFA a esta solución, la refracción doble de flujo prácticamente desaparecía y, además, el mismo TFA se desfosforilaba. Pero el hallazgo realmente excitante fue que en presencia de una gran cantidad de sal, las soluciones de miosina podían escurrir a través de un pequeño orificio, formando largos hilos y que éstos se acortaban cuando se añadía TFA. Posteriormente se encontró que otra clase de extracción del tejido muscular, producía las llamadas fibras glicerinadas, las cuales podían hacer se contraer más fácilmente y con mayor frecuencia cuando se añadía TFA. Se sabía, debido principalmente a los trabajos del fisiólogo **Hill**, que hay un requerimiento de energía para que se verifique la contracción del músculo y que este requerimiento de energía se puede expresar en equivalentes térmicos o eléctricos. Cuando también se encontró que durante la contracción aparecía fosfato inorgánico y desaparecían los ésteres Ca^{2+} en presencia del TFA; inhibir la actividad de la trifosfatasa de adenosina pero permitir al TFA reaccionar con la acto miosina y así conservar al fillamento en un estado de reposo y relajamiento.

ENERGETICA

No se tiene la seguridad de que el desdoblamiento del TFA está implicado en el hecho fundamental de la contracción muscular; en un tipo de experimentos de un solo paso, no se observó ningún cambio en las concentraciones celulares del TFA y del DFA. Sin embargo, en las células musculares existe otro compuesto de elevada energía, el fosfato de creatina o fosfocreatina. Este compuesto se forma cuando la enzima quinasa de la fosfocreatina actúa sobre la creatina y el TFA; también se forma en el proceso DFA. Esta reacción es completamente reversible de la fosfocreatina se forma TFA y DFA indicando esto que los enlaces fosfato de "elevada energía" del TFA y de la fosfocreatina se encuentran en el mismo nivel de

energía. Por lo tanto, hay grandes cantidades de fosfocreatina en las células musculares de los vertebrados (un compuesto similar, la fosfoarginina existe en los músculos de los invertebrados), se cree que es una clase de compuesto que sirve como depósito de energía al músculo, más aún, un trabajo reciente da a conocer que de hecho es el TFA el que disminuye en cantidad durante una sola contracción. Pero, no importando cuál sea el mecanismo íntimo que se verifica, no hay duda que en las células musculares existen grandes cantidades de compuestos de fosfato de elevada energía, TFA y fosfocreatina; que hay una disminución de fosfato de elevada energía durante la contracción muscular; y que, en el relajamiento, tiene lugar una resíntesis del fosfato de elevada energía. La cantidad de trabajo muscular depende de las concentraciones iniciales de estos compuestos y de las velocidades de su reconstrucción.

La eficiencia del trabajo muscular depende, como se bosquejó en un capítulo anterior, de la cantidad de energía libre que se puede obtener de una reacción química, siendo el resto de la energía transformado en calor. En este caso, la reacción química total es el desprendimiento de fosfato inorgánico del TFA. Puesto que no podemos hacer mucho para cambiar la eficiencia de esta reacción química, debemos pensar acerca de las otras posibilidades que gobiernen la cantidad y la velocidad del movimiento muscular: esto está relacionado con la forma de cómo la célula muscular genera continuamente energía.

Mecanismo químico postulado

Debemos examinar el diagrama de la Fig. 14-1. A la izquierda se encuentra el aspecto de las células musculares tal como se observa en la realidad aunque, por supuesto, este concepto deber ser revisado a la luz de los nuevos descubrimientos. La miosina reacciona con el TFA para formar un complejo de TFA-miosina. En presencia de K^+ y actina F, se forma TFA-actomiosina. Cuando se añaden Ca^{2+} y Mg^{2+} , este complejo desdobra al TFA dando fosfato inorgánico y formando, probablemente, un complejo de DFA-actomiosina, el cual luego se descompone para poner en libertad actina, miosina y DFA. No se sabe con exactitud, dónde tiene lugar la contracción en este esquema, pero se cree que ocurre cuando el complejo TFA-actomiosina actúa como una trifosfatasa de adenosina. Es más que un enigma saber cuándo actúa el factor de relajamiento aunque se supone en la actualidad que lo hace enlazando al Ca^{2+} y de esta manera inhibiendo el desdoblamiento del complejo TFA-actomiosina. Si esto fuera todo, resultaría una sola contracción, puesto que la fibrilla permanecería falta de movimiento a menos que el DFA pudiera refosforilarse a TFA. Esta molécula de TFA sale de las fibrillas musculares y puede ser influenciada de varias formas. Dos moléculas de TFA pueden ser atacadas por la enzima muscular miocluinasa, la que cataliza una

reacción de transfosforilación, tomando un fosfato de uno de los del DFA y colocándolo en el otro DFA para formar FMA y TFA. Por otro camino el DFA puede reaccionar con la fosfocreatina, por medio de una quinasa fosfocreatina muscular, para formar TFA y creatina. En ambos casos se forma otra vez TFA para poder reaccionar con la miosina. Pero estas reacciones no son la respuesta del problema.

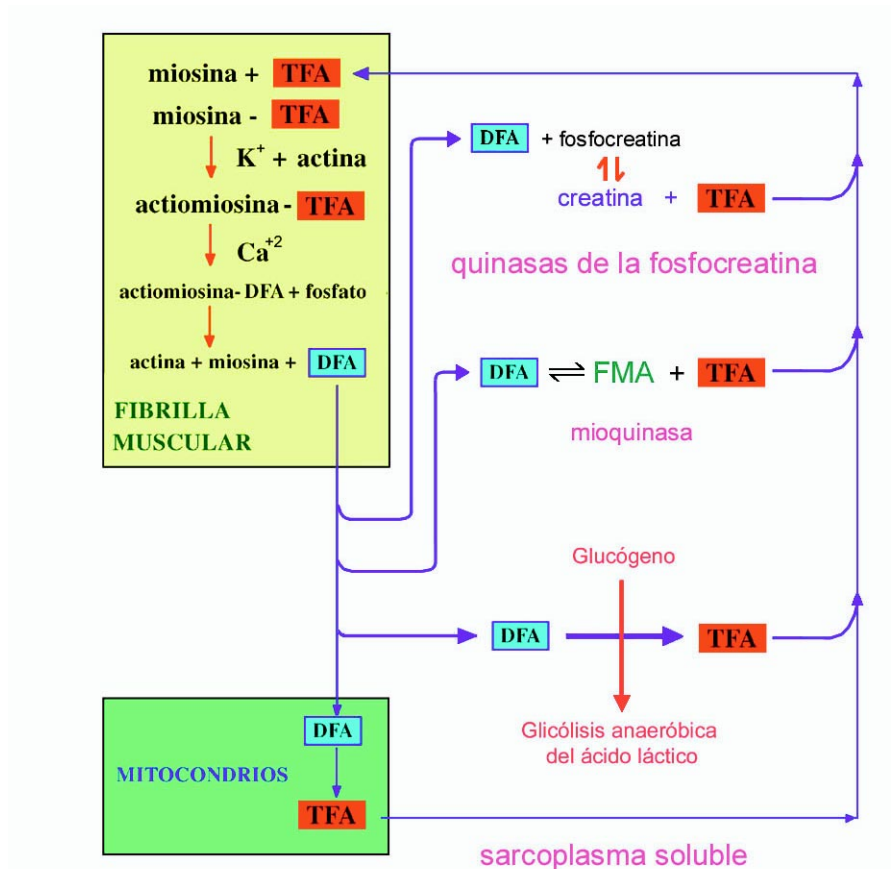


Fig. 14-1. Flujo de energía en el músculo. (Copia de P. Siekevitz, Ann N. Y. Acad Sci., 72, 1959)

En la reacción de la mioquinasas debe haber dos moléculas de DFA para formar una de TFA, en tanto que en el segundo caso, debe haber TFA para reconstruir la fosfocreatina; es así por qué la mayor parte de los bioquímicos juzgan a la fosfocreatina como un depósito de energía, que dura poco tiempo, hasta que el TFA pueda ser abastecido en exceso por algún otro medio. Este otro medio puede ser la producción de energía glicolítica.

En los primeros trabajos con fibras musculares se encontró que si éstas eran estimuladas por electricidad en ausencia de oxígeno se verificaba la contracción, pero había una acumulación de ácido láctico.

Cuando la estimulación se continuaba por algún tiempo, se provocaba un estado conocido como "fatiga muscular". Si este músculo fatigado se exponía a la acción del oxígeno, desaparecía el ácido láctico y el músculo recobraba su capacidad para contraerse. Si el músculo se contrae en presencia del aire, no se acumula ninguna cantidad de ácido láctico. Cuando el músculo fue estimulado en presencia de yodoacetato sustancia venenosa que inhibe la glicólisis así como la acumulación de ácido láctico aún se contrajo, pero al mismo tiempo, se observó que la fosfocreatina se descomponía en creatina y fosfato inorgánico. Cuando esta descomposición llegó a su término, no se verificaron más contracciones musculares. Bajo todas estas condiciones de contradicciones y relajamientos anaerobias, la concentración del TFA permanecía inalterada. De manera que puede decirse que, bajo condiciones anaerobias, en todos aquellos casos en que el abastecimiento de oxígeno (sangre) no es adecuado, el músculo se puede contraer empleando su fosfocreatina almacenada. Esto es lo que sucede durante un ejercicio sostenido; este depósito se vuelve a llenar durante el ejercicio por medio de la glicólisis de la glucosa.

Abastecimiento de energía: Glicólisis

La Fig. 14-2 es un esquema del camino glicolítico en el núcleo basado en el trabajo de **C. Cori** y **G. Cori** y de **Meyerhof** y **Emden**. El glucógeno muscular se desdobla en el fosfato de azúcar de 6 carbonos, el difosfato 1,6-fructosa, a través de diversos pasos enzimáticos intermedios, incluyendo uno que requiere TFA. Luego el difosfato de fructosa es desdoblado en dos compuestos de 3 carbonos, los cuales se encuentran en equilibrio entre sí. Uno de éstos, el fosfato 3-gliceraldehído, es oxidado a ácido 3-fosfoglicérico, generando TFA. Este paso, catalizado por la importante enzima deshidrogenasa del fosfato 3-gliceraldehído, es el único paso oxidativo en el camino glicolítico completo. El oxígeno no es necesario para esta oxidación, únicamente la presencia del ADN, el cual es reducido en el proceso a ADNH_2 . A través de varios otros pasos enzimáticos, se forma ácido pirúvico y, al mismo tiempo, se produce otra molécula de TFA. En condiciones anaerobias, este ácido pirúvico es reducido a ácido láctico por el ADNH_2 generado en el paso oxidativo de la glicólisis, volviéndose a formar ADN para su uso posterior en el paso oxidativo. En condiciones aeróbicas, el ácido pirúvico es oxidado, según el ciclo de Krebs, en los mitocondrios, siendo así desviada la formación de ácido láctico.

Puesto que se necesita un TFA para formar el difosfato de fructosa y puesto que se producen cuatro moléculas de él durante la glicólisis (generándose dos moléculas de fosfato 3-gliceraldehído de 3 carbonos, del fosfato de azúcar de 6 carbonos), se obtiene una producción neta de tres moléculas de TFA por cada mol de glucosa que se desdobla del glucógeno.

Cuando se acumula el ácido láctico bajo condiciones anaerobias, se traslada entonces al hígado a través de la sangre, y ahí es transformado en glucógeno del hígado. El glucógeno muscular es reconstruido por medio de un proceso que comienza con la degradación del glucógeno del hígado, y llegando a la sangre la glucosa libre producida. De la sangre, atraviesa las membranas de las células musculares, es fosforilada a fosfato-6-glucosa y luego transformada a fosfato L-glucosa. La glucosa de este compuesto es luego transferida, a un compuesto de glucosa "activo", el fosfato de uridínglucosa, con ayuda del TFA. Este compuesto de glucosa "activo" pone en libertad a su glucosa enzimáticamente cuando aún se encuentra presente una pequeña cantidad de moléculas de glucógeno muscular; de esta manera, el glucógeno es formado por gran número de unidades de glucosa. Puesto que por este camino, se necesita una molécula más de TFA (por la enzima hexoquinasa para formar el fosfato-6-glucosa), el resultado neto de la glicólisis que parte de la glucosa libre es solamente de dos moléculas de TFA. De esta manera, si se obtienen 20000 a 30000 calorías de energía, biológicamente utilizables en forma de TFA (aproximadamente 10000 calorías por TFA) proceden de un rendimiento total de energía calorífica de aproximadamente 58000 calorías, para ir de la glucosa al ácido láctico, ésta es una eficiencia del 30 al 50%.

El TFA que es producido en esta forma, puede fosforilar a la creatina, regenerando otra vez a la fosfocreatina. Esta producción de fosfocreatina se hará hasta que exista glucógeno muscular disponible. Pero, puesto que el glucógeno muscular está siendo constantemente reconstruido del glucógeno del hígado, podemos decir que éste es el último depósito de energía para el movimiento muscular. Sin embargo, el paso anaerobio completo, conduciendo a la producción de ácido láctico, probablemente se efectúa sólo bajo condiciones de emergencia ya sea un movimiento muscular sostenido o un largo o repentino ejercicio muscular. Bajo condiciones aeróbicas, el ácido láctico nunca se acumula, y el ácido pirúvico es oxidado por los mitocondrios; de esta forma se obtiene más energía procedente de la esencial oxidación completa de la glucosa, a través del piruvato, dando bióxido de carbono y agua.

Cuando el piruvato es oxidado completamente por los mitocondrios, se obtienen 15 moles de TFA por mol de piruvato oxidado, o 30 moles por mol de glucosa. Esto es, aproximadamente, 10 veces más de energía de TFA obtenida de la glicólisis anaerobia de la glucosa.

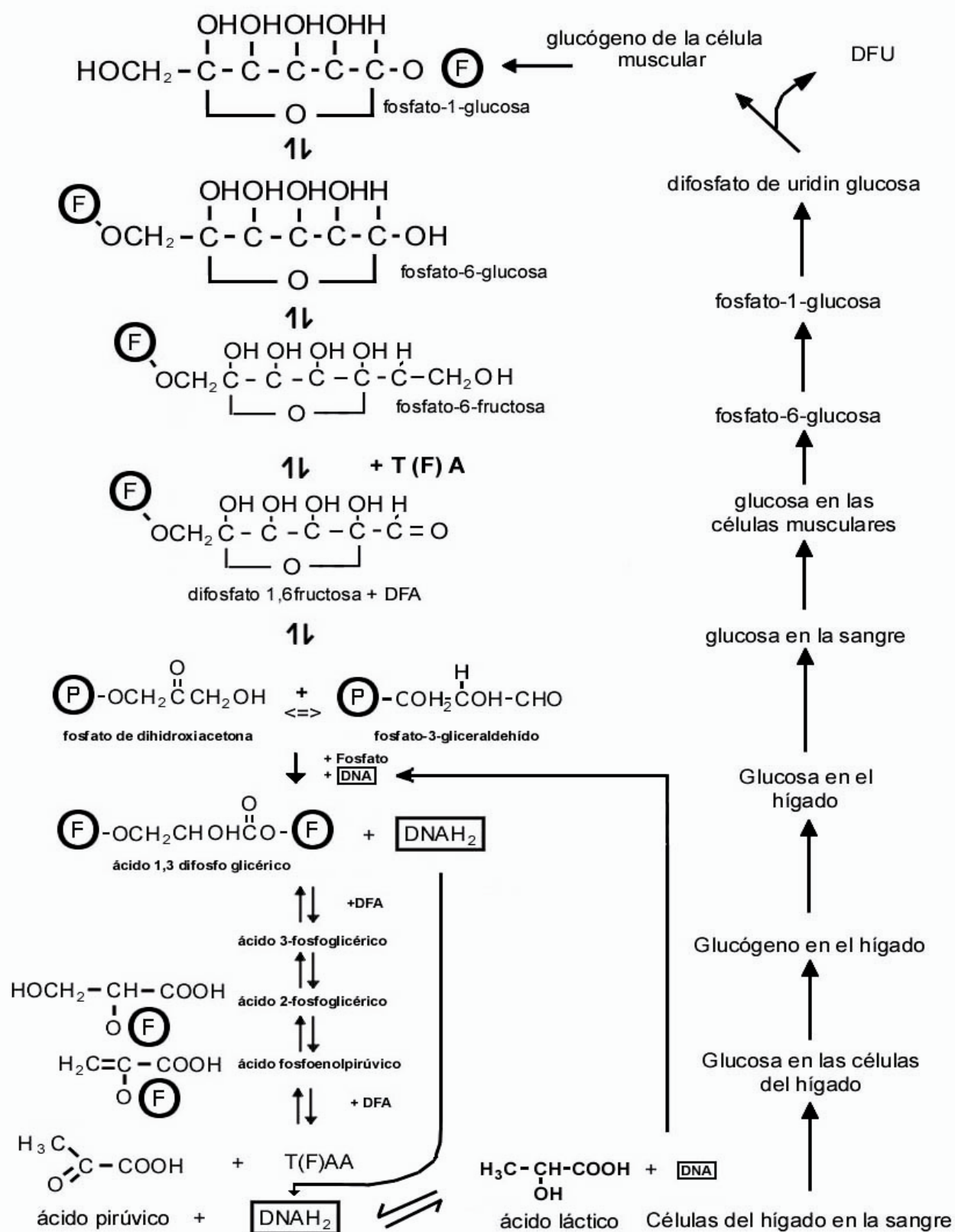


Fig. 14-2. Glicólisis en la célula muscular

Abastecimiento de energía: Mitocondrios del Músculo

Por esta razón no es sorprendente encontrar muchos mitocondrios en las células musculares y más aún, en las células del músculo del corazón, cuyas fibras están continuamente relajándose y contrayéndose, que en las células de los músculos estriados que actúan intermitentemente. La Fig. 14-3A muestra un aspecto típico de los mitocondrios del corazón entre las fibrillas, en tanto que las Fig. 13-3B y C muestran lo mismo pero en un músculo estriado. En ambos casos, los mitocondrios están íntimamente unidos a las fibrillas musculares, para facilitar el intercambio de los materiales solubles entre las dos estructuras. En el primer caso, los mitocondrios quedan entre las fibrillas, en tanto que en el segundo caso, los mitocondrios más numerosos están cerca de las bandas I. El DFA, producido como resultado de la contracción fibrilar, puede salir de las fibrillas y penetrar en los mitocondrios; si existe suficiente sustrato oxidable útil, se oxida y, concomitantemente, el DFA es fosforilado a TFA.

Este sistema completo es probablemente un sistema de finas mallas. Los experimentos efectuados en mitocondrios aislados, indican que éstas duran más, desde un punto de vista metabólico, cuando están produciendo un trabajo que cuando no lo hacen. Si los mitocondrios son aislados y se les deja simplemente a la temperatura del cuarto, pronto pierden su capacidad para oxidar la mayor parte de los sustratos. Sin embargo, si se les hace oxidar sustrato mientras se les deja, pueden continuar oxidándolo por largo tiempo. El tejido muscular parece tener la misma naturaleza: si las conexiones nerviosas del músculo están rígidas, haciéndolo incapaz para funcionar, en un tiempo relativamente corto el tejido muscular comienza a degenerar. También sabemos que el tejido muscular puede hacerse "desarrollar" haciéndolo trabajar. Lo que esto significa bioquímicamente es que al contraerse el músculo y desdoblarse al TFA en DFA, éste penetra en los mitocondrios y ahí actúa como un aceptor de fosfato, como se explicó en un capítulo anterior. Si hay sustrato disponible, el paso del DFA de las fibrillas a los mitocondrios, actúa como un estimulante de éstos; el sustrato es oxidado: y se produce TFA, y otra vez vuelve al ciclo a través del sistema de las fibras musculares. En otras palabras, los mitocondrios parecen ser capaces de responder al DFA, para formar TFA, durante tanto tiempo como éste se necesite. Si el músculo se contrae continuamente, un abastecimiento sin interrupción de DFA alimentar a los mitocondrios, los cuales responderán, fabricando TFA.

Si no hay necesidad de que la contracción continúe; si no hay necesidad de TFA, no se forma DFA y, por lo tanto, no se genera TFA. Debido a que la energía es preciosa, la naturaleza parece que ha construido un sistema, en el cual, no se produce más energía que la que se utiliza. Se debe señalar, sin embargo, que esta idea de la relación simbiótica entre las fibrillas musculares y los mitocondrios del



Fig. 14-3 A: Miocardio de ratón, corte longitudinal (x 20000) B: Músculo estriado, corte longitudinal (x 15000) C: Músculo estriado corte oblicuo (x 15000). M, mitocondrios; Sr, retículo sarcoplasmático; P, miofilamentos; Z, línea Z; H, región H; I, banda I. (Cortesía de G. Palade, Rockefeller Institute).

músculo está basada en resultados obtenidos de experimentos hechos con mitocondrios aislados, y tienen poco que hacer con la realidad celular. No obstante, para muchos bioquímicos esto semejaría ser una verdadera imagen significativa de lo que sucede *in situ* en la célula muscular.

MECANICA MACROSCÓPICA

Sabemos algo acerca de los requerimientos de energía para la contracción del músculo y bastante, también, concerniente a los elementos moleculares implicados, pero aún tenemos mucho que descubrir en lo que se refiere al mecanismo macroscópico. Sabemos que el hecho inicial es la despolarización de la membrana de la célula muscular que es afectada por un impulso eléctrico procedente de los nervios. También sabemos un poco de lo referente a la estructura macroscópica del músculo y lo que le sucede a esta estructura durante la contracción. Los tejidos musculares están divididos en tres clases principales: el liso, el estriado y los músculos del corazón.

El más conocido de los tres, es el músculo estriado. Es lo que se llama musculatura roja, los músculos con que movemos a voluntad nuestros huesos y que constituye la mayor parte del tejido muscular. Los otros tipos de músculos son involuntarios, es decir, no están bajo nuestro control nervioso consciente. Los haces musculares estriados, llamados así debido a que si se les observa al microscopio, se pueden ver claramente las bandas oscuras transversales de las fibras. Estos haces musculares están compuestos de células, cada una de las cuales tiene cierto número de fibras longitudinales.

Estas células tienen muchos núcleos y numerosos mitocondrios, estos últimos colocados entre las fibras. Estas terminan en los tendones o directamente en los huesos, por lo que la contracción se verifica por medio del acortamiento de estas fibras. Las fibras celulares están formadas, a su vez, de fibrillas individuales y son las estriaciones repetidas de estas fibrillas las que dan el nombre a este tipo de músculo. La unidad repetida, de la cual debe haber miles en cada fibrilla, se denomina sarcómera. La Fig. 14-3 muestra una micrografía, en tanto que la Fig. 14-4 da un esquema de una sarcómera, con los símbolos universalmente empleados para designar las diferentes regiones de luz y oscuridad alternadas o bandas isotrópicas (L) y anisotrópicas (A). Las líneas Z sirven como inserciones para un número (100 a 1500) de filamentos de actina, en tanto que la región A tiene de 50 a 750 filamentos de miosina. Cuando un músculo se contrae, parece que la región clara I menos densa, prácticamente desaparece. No hay cambio en la región oscura A más densa; verdaderamente se tiene la impresión de que esta región, en especial el segmento de la región I, se vuelve en realidad más ancha. En la actualidad se

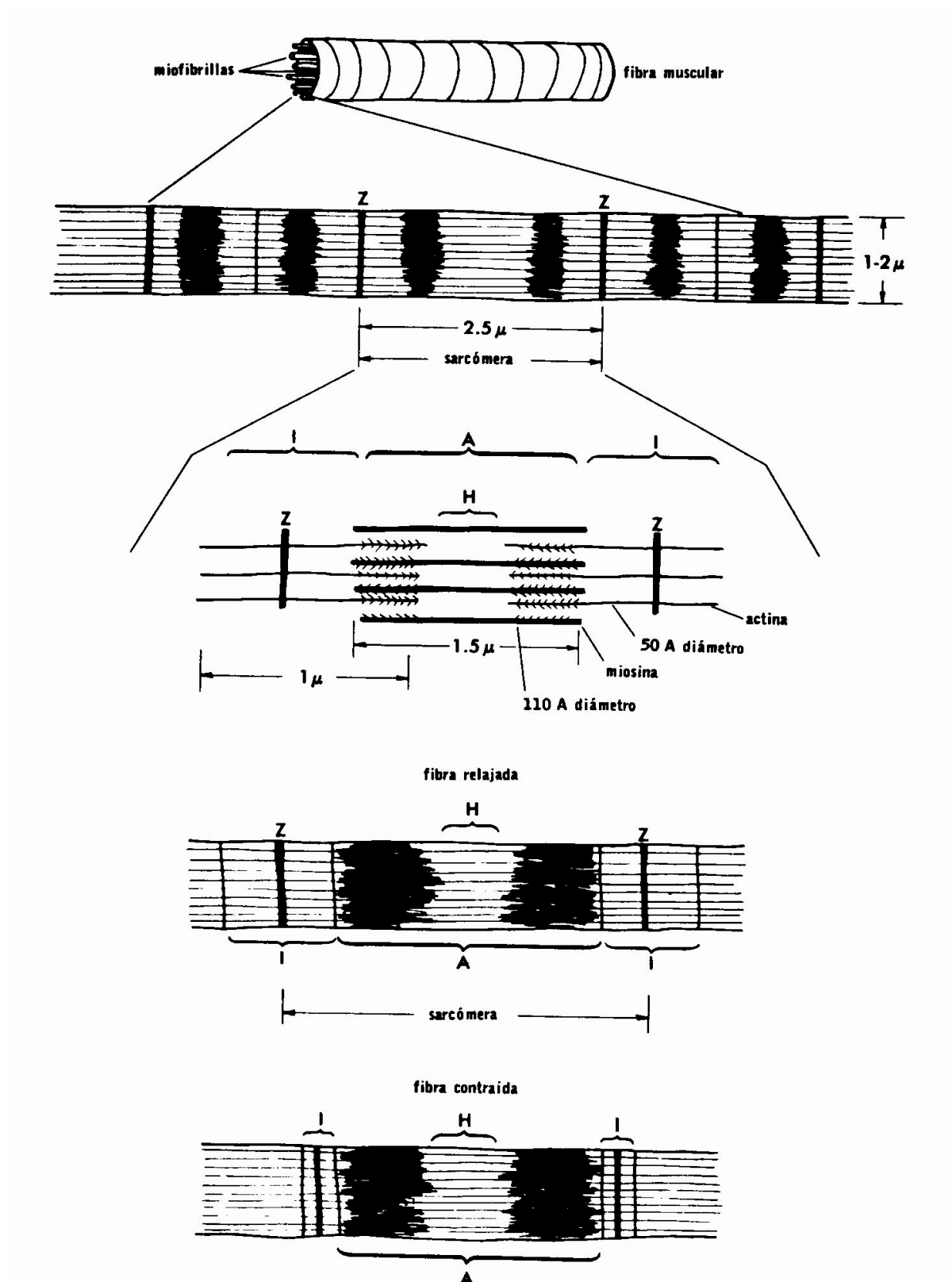


Fig. 14-4. Estructura de un músculo estriado (esquemática).

cree que las fibrillas compuestas exclusivamente de miosina, forman una buena parte de la región A, ya que se extienden desde el borde de una región I hasta los linderos de la región I adyacente. La actina parece que se encuentra principalmente en los filamentos que se extienden desde el borde de la región H, a través de la línea Z, hasta el borde de la región H de la sarcómera adyacente. Así, parece que la fibrilla que realmente se contrae, la actomiosina, se encuentra solamente en la región A, en cualquier lado de la región H. Efectivamente, **H. Huxley** observó en algunas fibras musculares, que existen verdaderos puentes entre el delgado filamento de actina y el grueso de miosina precisamente en la región A, fuera de la banda de H.

Han sido propuestos dos mecanismos para explicar la contracción, aunque ambos están de acuerdo en la existencia de dos clases de proteínas musculares, una activa y móvil, y la otra, fija. En el primero de los casos, que es el del mecanismo plegadizo, se ha postulado que el TFA se desdobla originando que ciertas moléculas de proteínas largas se contraigan de una manera semejante a un acordeón; las proteínas musculares fijas y que se encuentran unidas a estas proteínas contráctiles, son removidas de esta manera, a medida que los puntos de anclaje se van juntando cada vez más. En la hipótesis del mecanismo deslizante, se cree que el desdoblamiento del TFA tiene lugar en serie a lo largo de la fibrilla; cuando esto sucede, los enlaces que sostienen a las proteínas móviles unidas a las estacionarias, se van rompiendo paulatinamente, permitiendo, en alguna forma quizás debido a las cargas opuestas de las dos proteínas deslizarse una proteína sobre la otra. En otras palabras, se ha propuesto que la actomiosina se contrae debido a que los filamentos de actina se deslizan sobre los de miosina cuando se hidroliza el TFA; esto da por resultado el efecto observado de traer a las líneas Z más juntas unas de las otras. Al presente, la selección entre estas dos hipótesis se inclina hacia el mecanismo del deslizamiento, aunque realmente no existe ninguna evidencia definitiva para ninguna de las dos.

La fisiología de la célula muscular es un campo excitante y maravilloso. Cuando consideramos lo intrincado del músculo del corazón, por ejemplo, en el cual los principios de la mecánica, de la química y de la electricidad están finamente combinados dentro de un todo que puede funcionar continuamente por muchos años, no nos queda más que maravillarnos. Para el bioquímico y para el citólogo, la célula muscular es ese raro recurso que permite estudiar los medios eficientes, con los cuales la naturaleza transforma la energía química en energía mecánica. En un futuro no muy lejano, esperamos conocer el verdadero mecanismo.

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

Axelrod, B., "Glycolysis." In Greenberg, D. M. (ed.), 1960. *Metabolic pathways*. New York: Academic Press. Vol. 1, p. 97.

Finean, J. B., 1962. *Chemical uhrastructure in living tissues*. Springfield, Ill.: Charles C Thomas.

Huxley, H. E., "**Muscle cells**." In Brachet, J., and Mirsky, A. E. (eds.), 1960. The cell. New York: Academic Press. Vol. 4, p. 365.

— — —, "The contraction of muscle," *Scientific American*, November 1958.

"Metabolic factors in cardiac contractility," *Annals of New York Academy of Science*, Vol. 72 (1959), Art. 12.

CAPITULO QUINCE

EL SISTEMA DE LA MEMBRANA Y EL INTERCAMBIO DE MATERIALES

Todas las células están constantemente intercambiando compuestos con su medio ambiente. Los organismos unicelulares como los protozoos, las bacterias o las levaduras toman de su medio ambiente el alimento y dejan en él los productos excretores y en algunos casos los secretorios. La célula de un organismo pluricelular debe obtener su alimento del que circula en la sangre y también secreta sus productos de desecho y algunas veces sus productos específicos, como proteínas de la sangre, azúcares u hormonas, dentro del torrente sanguíneo. Todos estos intercambios son específicos porque solamente determinados compuestos penetran dentro de la célula, y sólo otros salen de ella. El mecanismo de esta especificidad reside, casi por completo, en las membranas del plasma que rodean a las células.

ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA

Las membranas se pueden aislar. El método más fácil es convertir a los glóbulos rojos en "fantasmas"; todo lo que queda después de cierta clase de extracción es la membrana del plasma. Tomando como base el análisis químico de éstas y otras fracciones de membrana, se tiene actualmente la seguridad de que las membranas son primordialmente estructuras lipoproteicas, posiblemente con pequeñas cantidades de otros compuestos unidos a ellas. Las lipoproteínas son complejos entre moléculas de proteína y fosfolípidos o esteroides, en las cuales, los grupos ionizados de las proteínas, como los amino grupos cargados, están electrostática-

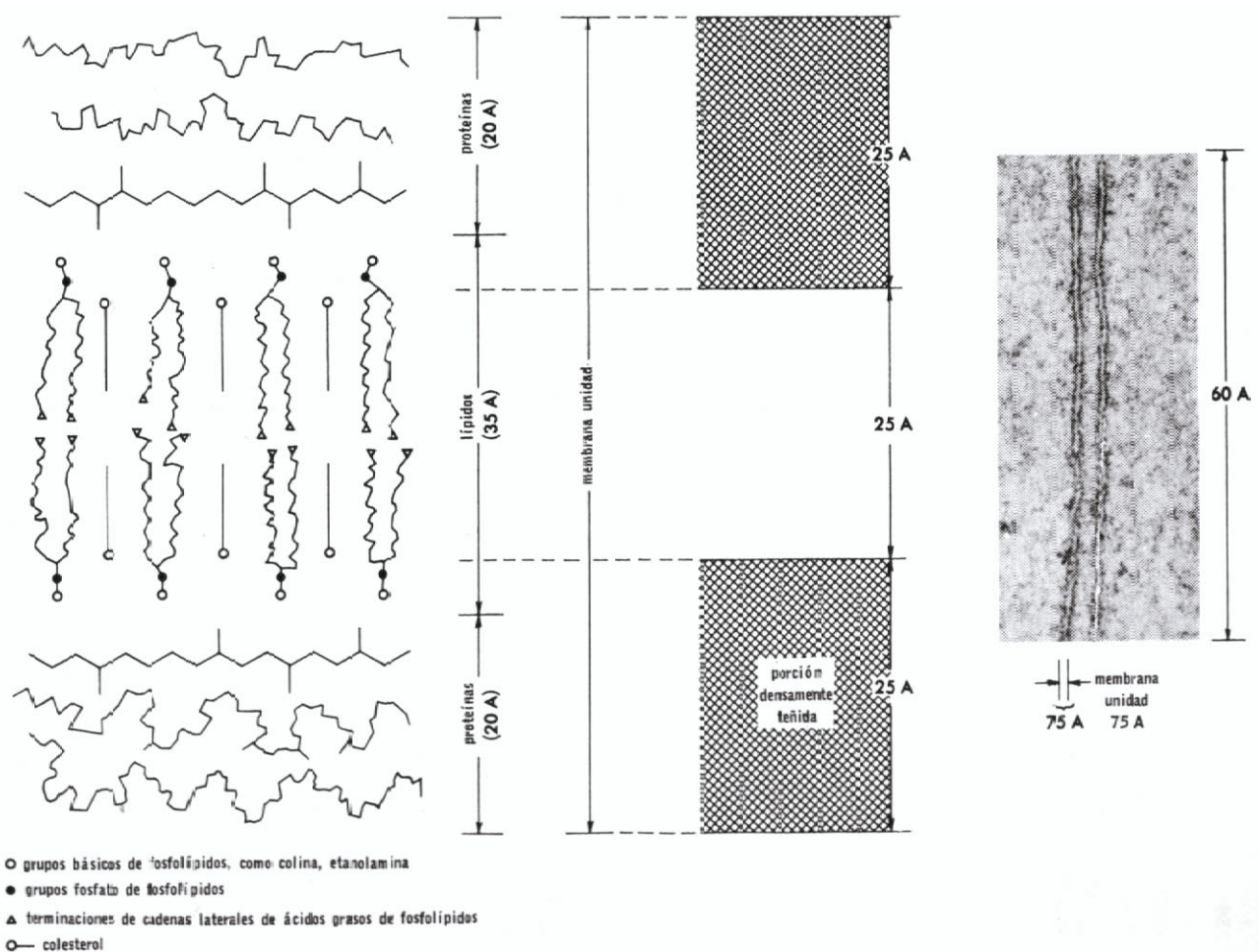


Fig.15-1 Diagrama químico de la membrana unidad y de la membrana tal como se observa con el microscopio electrónico. (Según Danielli, Robertson; microfotografía cortesía de W. Stoeckenius, Rockefeller Institute)

mente unidos a grupos cargados de los lípidos, los grupos fosfato e hidroxilo. La Fig. 15-1 es un esquema similar al originalmente propuesto por Danielli, de la apariencia química de una membrana; con la proteína cubriendo la capa de lípido. La unidad de 75 Angstroms de ancho, ha sido denominada por D. Robertson "*membrana unidad*" para significar su universalidad celular. Sus relaciones con lo que se puede observar en el microscopio electrónico, también se indican en la figura. La estructura resultante tiene propiedades tanto hidrofílicas como lipofílicas y es, al mismo tiempo, fuerte, resistente al corte y a la ruptura, pero flexible.

Pero su mayor ventaja como membrana parece ser su propiedad de semiexclusividad, o semipermeabilidad, que probablemente proviene de la naturaleza lipofílica de la estructura, conservando las moléculas ionizadas excepto bajo ciertas circunstancias. (La ionización de un compuesto disminuye notoriamente su permeabilidad a través de las membranas biológicas).

Son estas condiciones determinadas las que constituyen la especificidad. A causa de su naturaleza hidrofílica, se pensó, durante mucho tiempo, que la membrana poseía poros; éstos podían ser los causantes de su permeabilidad a los pequeños compuestos solubles en agua, pero, cómo podía pasar también un pequeño número de iones cargados? No existen, sin embargo, pruebas de la existencia de poros, excepto para aquellos tan pequeños que permiten el paso de las moléculas de agua. Debe suponerse, por lo tanto, que existe otro mecanismo para la penetración.

Propiedades de permeabilidad

La membrana del plasma de la célula no es una estructura estática. Trabaja, no solamente como una barrera semipermeable, sino también como una vectorial, en la cual, la dirección del flujo del compuesto es tan importante como la propia naturaleza del compuesto. A causa de esta propiedad, la membrana tiene la capacidad de permitir que ciertos compuestos atraviesen la célula de una solución exterior menos concentrada a la solución interior más concentrada; es decir, moverse contra un gradiente de concentración. Por ejemplo, la mayoría de las células conservan la concentración de su ion potasio más alta que la de su medio ambiente, y si esta concentración interior disminuyera, la célula tomaría su potasio contra el gradiente de concentración. Muchos otros compuestos se comportan de una manera similar, por lo que toda clase de células debe tener un mecanismo para conservar su ambiente intracelular constante frente a un ambiente exterior variable. De este solo hecho, debemos suponer que se necesita energía para el transporte de materiales a través de la membrana, puesto que muchos de estos materiales, por decirlo así, tienen que subir una colina. Efectivamente, parece ser que la mayor parte de la energía de la célula se utiliza justamente en el transporte de materiales dentro y fuera de la célula.

Esto no quiere decir que todos los materiales estén conducidos activamente contra gradientes de concentración; algunos pasan a través de las membranas por simple difusión de la solución más concentrada a la menos concentrada. No obstante, gran cantidad de membranas procedentes de toda clase de células bacterias, levaduras, glóbulos rojos, células del riñón, epiteliales, musculares son extraordinariamente impermeables a gran número de sustancias a menos que algún proceso facilite el paso de estos compuestos. Entre estas sustancias se encuentran muchos iones inorgánicos, tanto cationes como el sodio y el potasio, aniones, como el fosfato y el sulfato, y azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y aun hasta el agua misma. Es sorprendente que estas diferentes clases de células se comporten casi de la misma manera bajo idénticas condiciones de experimentación; en otras palabras, parece que las membranas del reino biológico tienen propiedades similares.

Así, se han efectuado experimentos con varias clases de células convenientes, como células de levaduras, glóbulos rojos, o bacterias. Estas células se han incubado en un medio que contenga, con varias adiciones, los compuestos cuya permeabilidad se desea probar y luego son centrifugadas de este medio. Las concentraciones de estos compuestos se miden al principio y al final del experimento tanto las del medio como las del interior de las células. De esta manera se puede determinar si las células toman los compuestos, y también algo relacionado con los mecanismos por medio de los cuales lo efectúan. Se pueden hacer a veces, ciertas preparaciones de órganos completos, como cortes de vejiga o riñón, tiras de diafragma o de mucosa intestinal, o preparaciones de epidermis de rana, a causa de que en estos especímenes, las células que están recubriendo los órganos o los tejidos, se encuentran polarizadas; es decir, presentan una cara distinta en el exterior y otra en el interior unida a las otras células del órgano. La estructura de estas dos caras es completamente diferente una de otra; por ejemplo, muchas de estas células tienen en su parte exterior, los llamados bordes cerdosos, que son en realidad, finas vellosidades que aumentan el área de la superficie membranosa. En muchos casos, hasta el interior de la célula se encuentra polarizado, como en las en que los mitocondrios se hallan en un extremo de la célula. Pero cualquier cosa que pruebe la célula, parece que siempre los mismos compuestos se mantienen fuera de las células a menos que un mecanismo particular los haga penetrar. De lo que nosotros sabemos hasta ahora, el mismo mecanismo para el transporte del potasio se verifica en todas las clases de células, el mismo mecanismo para el movimiento de los azúcares se opera en todas las células, y así por el estilo. La mayoría de estos mecanismos requieren un enlace energético para el transporte y este abastecimiento de energía se obtiene en último término y parece ser que en algunos casos específicamente, del TFA. A tal sistema de enlace energético se le ha dado el nombre de "*transporte activo*".

En el interior de casi todas las células, la concentración de potasio total es mucho más alta que en su medio ambiente inmediato y aún más, el elemento se encuentra, en su mayor parte, bajo la forma de iones K^+ libres. El magnesio parece comportarse en una forma similar. La concentración alta tiene lugar debido a que la célula puede tomar K^+ a una velocidad mayor de la que puede dejarlo salir, y no porque la membrana sea impermeable al K^+ ; en esta forma parece existir un coeficiente vectorial a la permeabilidad de la membrana (Fig. 15-2). La conservación de esta concentración intracelular requiere energía para que los glóbulos rojos y las células nerviosas -- no así las células musculares -- pongan en libertad dentro del medio, apreciables cantidades de K^+ si se encuentran bajo condiciones anaerobias, y esta pérdida puede evitarse por adición de glucosa al medio. La glucosa es metabolizada por las células, indicando esto que el gradiente para el K^+ se conserva gracias a un abastecimiento constante de energía metabólica. En realidad se cree que la energía

está implicada en el bombeo de Na^+ hacia el exterior, actuando el K^+ pasivamente para conservar la concentración iónica. Poco más o menos el mismo mecanismo se ha mostrado que tiene lugar en las células de las bacterias y de las levaduras.

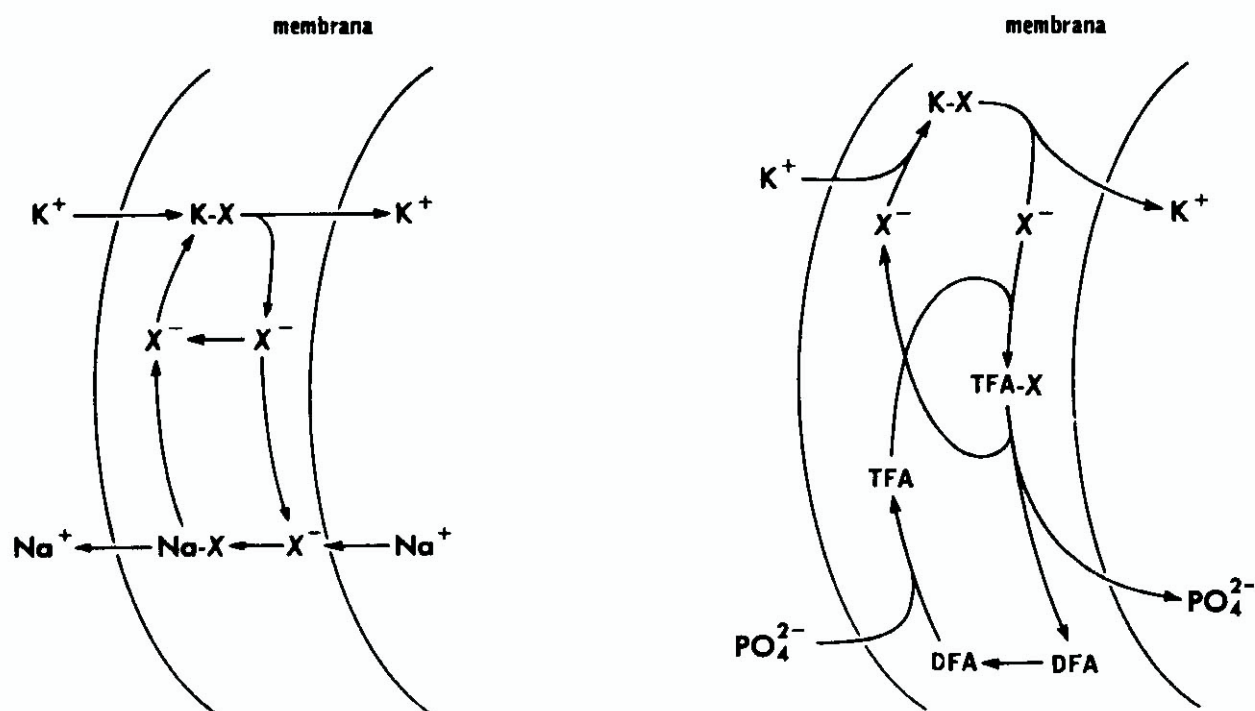


Fig. 15-2. Esquema postulado para el transporte del Na^+ y del K^+ a través de las membranas

Además, en las células nerviosas, el flujo de Na^+ y de K^+ hacia adentro y hacia afuera de la célula está conectado en alguna forma con una polarización de la membrana; la corriente que fluye a lo largo de la membrana de la célula nerviosa parece que está correlacionada con un movimiento del K^+ desde el interior hacia el exterior de la célula, haciendo el Na^+ lo contrario.

La fase de recuperación —la despolarización de la membrana, viéndola por medio de la siguiente ortda de potencial eléctrico— corresponder, por lo tanto, a un movimiento del Na^+ hacia el exterior, y del K^+ hacia el interior. Puesto que en ambos casos el flujo del catión está en contra del gradiente de concentración, tiene que verificarse un trabajo y necesitarse energía. De esta manera, en el caso de la célula nerviosa, se verifican dos mecanismos de transporte de iones, uno conectado con un gradiente electroquímico y dependiente de un estímulo exterior, y el otro sujeto al abastecimiento de energía generada célula por la fécula misma.

La membrana que rodea a las fibras musculares, llamada sarcolema, también se cree que sea la responsable de su medio iónico en la misma forma. De alguna

manera el impulso procedente de las terminaciones nerviosas en el sarcolema debe ser transmitido al interior de las fibrillas nerviosas y se piensa que en determinados lugares, a lo largo del sarcolema, existe un contraflujo de Na^+ y de K^+ . La separación resultante del flujo de iones origina un gradiente electroquímico en ese lugar. Es un misterio de cómo este gradiente o polarización se transmite al interior de los haces fibrosos, pero se ha representado como si se trasladara a lo largo de las membranas llamadas colectivamente retículo sarcoplasmático, para penetrar dentro de las fibras (véase la Fig. 14-3). Este movimiento puede ser de la misma clase que el que se representa a lo largo de la membrana de la célula nerviosa, en la que existen una onda de K^+ que sale y una de Na^+ que entra a la célula, seguidas por otra onda de K^+ que entra y una de Na^+ que sale.

HIPOTESIS

Transporte de iones

Se desconoce el mecanismo íntimo por el cual estos iones atraviesan las membranas y la forma como se abastecen de energía. En los últimos años se han sugerido varias hipótesis para dar una explicación de estos hechos pero hasta el presente, no hay certidumbre acerca de la veracidad de ningún esquema.

No obstante, se presentarán aquí algunas de las ideas más aceptadas debido a que creemos que los actos celulares se efectúan realmente en una forma generalizada y que estas ideas encierran el meollo de la verdad. Recientemente ha habido indicaciones de que el TFA mismo está implicado tanto en el abastecimiento de energía como en el mecanismo de transporte. Actualmente se ha descubierto que en toda clase de células se encuentra una trifosfatasa de adenosina que está localizada en las membranas microsómicas y probablemente, en la membrana del plasma. Se hizo el interesante descubrimiento de que la trifosfatasa de adenosina, que se activaba por Mg^+ podía ser además estimulada por la adición de Na^+ y de K^+ y que esta activación era inhibida por compuestos que anteriormente se habían encontrado ser inhibidores del transporte activo. ¿Podríamos hacer un esquema que represente el transporte activo de acuerdo con estos descubrimientos? (Véase la Fig. 15-2).

La idea que prevalece actualmente acerca del transporte de las sustancias – no solamente cationes sino también azúcares y otros compuestos – a través de las membranas es que obra un sistema de transporte, donde un transportador específico para la sustancia en cuestión fija al compuesto por un lado, de la membrana lo lleva al otro lado, deja al compuesto y entonces regresa para estar listo otra vez para recoger otra molécula de la sustancia. De esta manera, las sustancias ionizadas

pueden ser neutralizadas combinándose con otro compuesto, el transportador hipotético. Se desconoce lo que este transportador X puede ser, pero en el caso del transporte del Na^+ y del K^+ se cree actualmente que es posiblemente el mismo TFA o el compuesto X-TFA. El mecanismo completo podría actuar como se muestra en la Fig. 15-2. El K^+ se combina con X para formar $\text{K}^+\text{-X}$, el cual, entonces, se traslada a través de la membrana y descarga el K^+ al interior de la célula, quedando todavía X en la membrana. Luego se combina con el TFA para formar X-TFA. Esta sustancia hipotética es atacada entonces por una trifosfatasa de adenosina dando DFA y fosfato inorgánico, y se pone en libertad nuevamente X.

Este X libre puede entonces tomar otro K^+ y el DFA debe fosforilarse nuevamente dentro de la membrana por algún mecanismo para dar otra vez TFA.

Se ha propuesto un enfoque diferente, basado en los últimos hallazgos de que los conjuntos de transporte electrónicos de los mitocondrios que son partes de estructuras osmóticamente activas, pueden actuar en la permeabilidad selectiva y acumular iones. El último proceso es esencialmente vectorial para un ion, es decir, que solamente un ion es transportado activamente, el otro ion en equilibrio eléctrico entra por el gradiente de potencial electroquímico así establecido. Si el Na^+ es transportado activamente, el Cl^- se difundir para equilibrar las cargas eléctricas de ese lado de la membrana. De esta manera se establece inicialmente una separación entre las cargas positivas y las negativas¹. Los iones hidrógeno y los electrones viajan por diferentes caminos, los primeros por la fase acuosa soluble y los últimos moviéndose en alguna forma directamente de un transportador a otro.

Recientemente, **Davies y Ogston, Conway, Robertson**, y particularmente **Mitchell**, han postulado que los dos procesos, el transporte de electrones y el transporte de iones: son, en realidad, el mismo mecanismo, pero visto desde diferentes puntos experimentales.

Esta hipótesis consiste en que la energía empleada para el transporte de ciertos iones, reside no en la información del TFA directamente, aunque esto ciertamente sucede al mismo tiempo, sino en la energía ganada por los electrones que pasan de un transportador reducido a uno oxidado, de un potencial más alto a uno más bajo. La Fig. 15-3 ilustra esta hipótesis en relación a la secreción "ácida" por varios tipos de células. El proceso del transporte electrónico de los mitocondrios por si mismo proporciona la energía. Asimismo, la cantidad vectorial aumenta en alguna forma debido al hecho de que el transporte electrónico es un proceso isotrópico, yendo por un lado los iones H^+ y por el otro los electrones.

¹ Se sabe desde hace tiempo que en las cuplas de oxidación reducción del sistema de transporte de electrones hay también una separación de cargas.

Puesto que la posición correcta de los transportadores de electrones es muy importante para que se verifique este proceso, una vez más –suponiendo que este esquema refleje efectivamente la realidad– se señala la necesidad de una estructura supra-molecular en la cadena transportadora de electrones del mitocondrio. Esto no quiere decir que todo el transporte de los iones tenga lugar a través de las crestas mitocondriales; lo interesante es que las membranas del retículo endoplásmico, o microsomático, contienen también una porción de una cadena transportadora de electrones, específicamente una enzima o enzimas que pueden transferir electrones del DNAH_2 a un citocromo microsomático distintivo, el citocromo b5. Que este fragmento transportador de electrones puede también actuar como una máquina transportadora de aniones es una posibilidad; como mencionaremos más adelante, existe una evidencia citológica para sugerir que estas membranas del retículo endoplasmático están en continuidad con la membrana del plasma de la célula, de aquí que sus componentes pueden tener acceso al medio ambiente exterior de la célula.

Este no es sólo el único esquema que se ha postulado. De las observaciones efectuadas en diversas clases de tejidos, particularmente en el exótico de la glándula secretora de sal del albatros, los **Hokins** han formulado el concepto que se ilustra en la Fig. 15-4. Este esquema está basado en el descubrimiento de las enzimas activas en las células glandulares, como la quinasa diglicérida y la fosfatasa del ácido fosfatídico, las que actúan sobre sustancias que son solubles en la parte lipoídica de la membrana. Además, (1) si la glándula de sal es estimulada para la secreción de NaCl por medio del secretagogo fisiológico, la acetilcolina, hay un marcado aumento en el desdoblamiento del fosfato del ácido fosfatídico, medido por el P^{32} ; (2) el aumento del ciclo del P^{32} depende de la presencia de Na^+ ; (3) este ciclo puede ser catalizado por las dos enzimas mencionadas anteriormente, como se muestra en la Fig. 15-4; (4) el ciclo tiene lugar en la fracción microsomática obtenida de las membranas de las células; y (5) el bastante rápido equilibrio del P^{32} no solamente con el ácido fosfatídico, sino también con los fosfatos del TFA, suministra la cinética de este esquema aceptable para su papel fisiológico postulado.

Las características sobresalientes de este esquema son: el ácido fosfatídico actúa como un portador de sodio; la enzima quinasa diglicérida reacciona con el diglicérido y con el TFA en una interfase; y los iones del fosfato inorgánico son impedidos de atravesar la superficie exterior de la membrana plasmática y deben regresar a la célula para ser finalmente incorporados al TFA, completando así el ciclo.

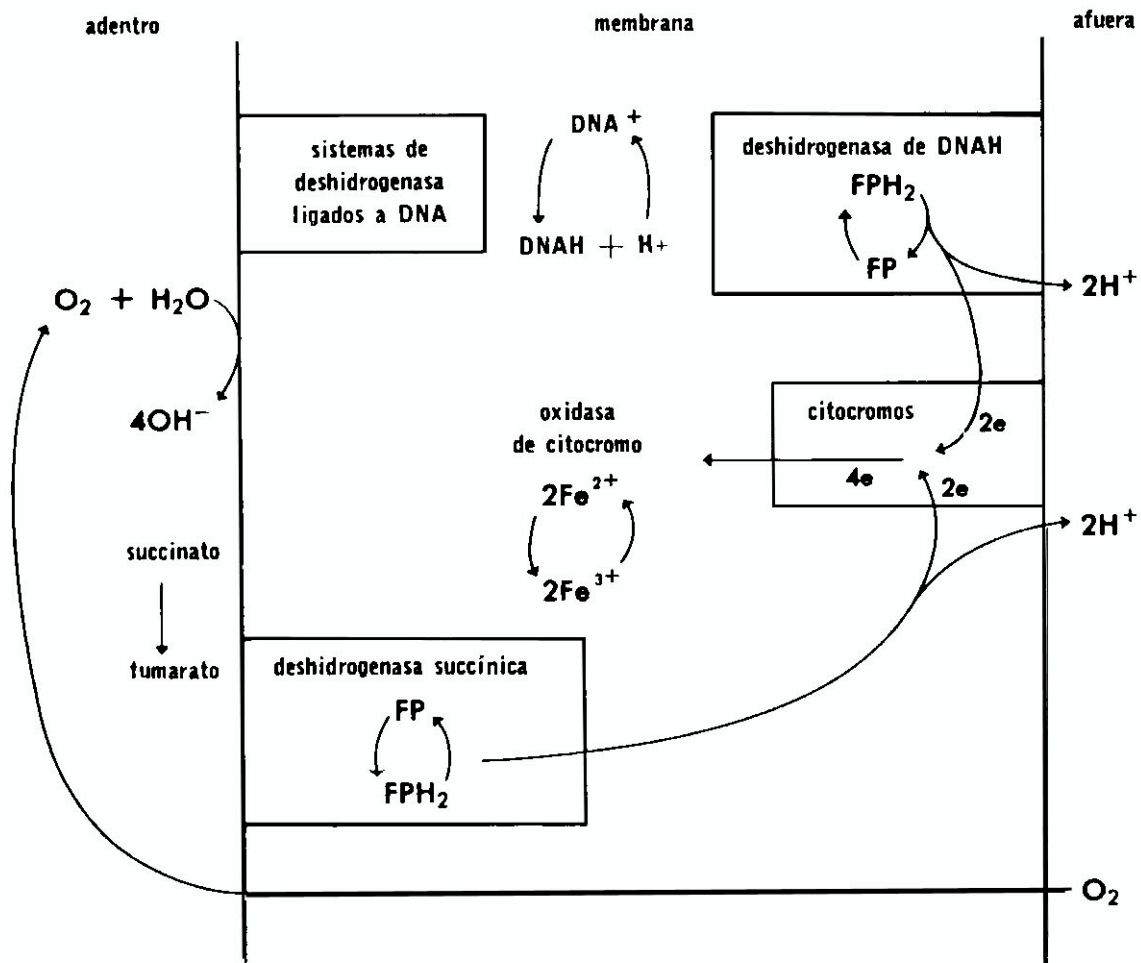


Fig. 15-3. Esquema postulado del transporte de "ácido" a través de la membrana. La "secreción" de H^+ está acoplada al transporte de electrones. (Modificado según P. Mitchell, *J. Gen. Microbiol.*)

La energía impulsora para el esquema es, por lo tanto, el TFA, proporcionando su fosfato terminal la fuerza necesaria para la circulación de los portadores móviles de uno al otro lado de la membrana. El comportamiento de las células nerviosas y musculares con respecto al intercambio de cationes a través de la membrana no es peculiar de este tipo de células. Las células de las levaduras y de las bacterias también realizan un activo transporte de K^+ , requiriendo un gasto de energía. Las células tubulares del riñón acumulan K^+ , lo mismo que los leucocitos.

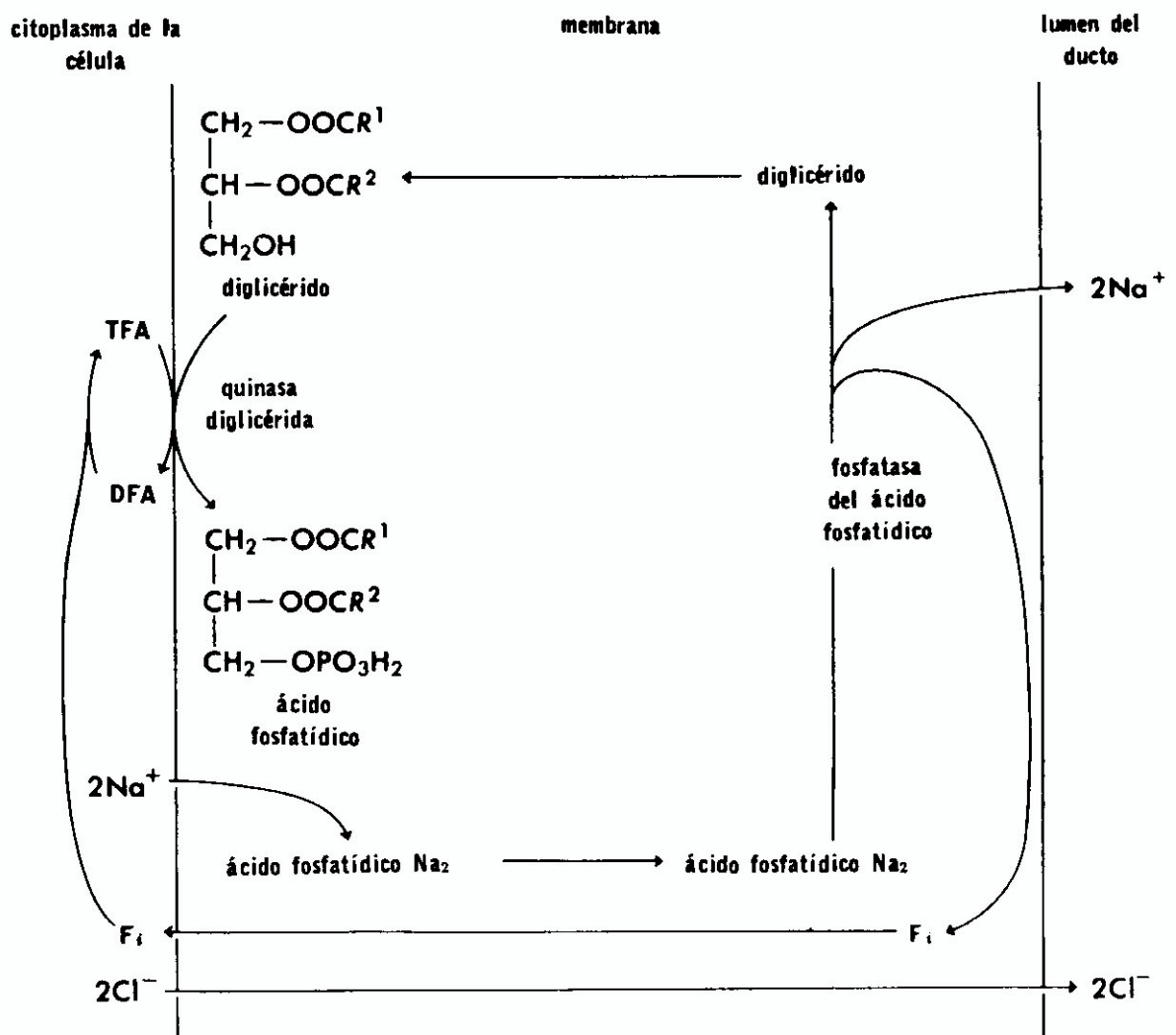


Fig. 15-4. Esquema referente a la asociación del transporte del Na^+ con el metabolismo del ácido fosfatídico. (Según Hokin y Hokin, *J. Gen. Physiol.*, 44, 1960)

En contraste con las dificultades que las células encuentran para acumular estos cationes un proceso que requiere energía los aniones como el Cl^- , parece que atraviesan las membranas sin ninguna asistencia metabólica. Una excepción es el fosfato inorgánico, ya que se necesita energía para transportar fosfatos a través de las membranas de los glóbulos rojos, dentro de las células musculares, en los huevos marinos, en las células de levadura y dentro de las células tubulares del riñón. Todos

los experimentos efectuados con fosfato inorgánico llegan a la conclusión de que esta molécula logra atravesar bajo la forma de anión PO_4^{2-} . Se cree que, en algunos casos, atraviesa como formando parte de la molécula del TFA, que el requerimiento de energía reside en la fabricación del TFA y que esto tiene lugar en la membrana de la célula. Si existe una trifosfatasa de adenosina en la membrana de la célula, separa el fosfato, y entonces la mitad del adenilato puede considerarse como un portador de fosfato. La evidencia no llega a la conclusión de que existe una trifosfatasa de adenosina en la membrana de la célula de levadura como también en la de las bacterias y en la superficie de las células de glóbulos rojos. En algunos casos, el transporte de K^+ hacia el interior se ha unido con el transporte del fosfato, en el mismo sentido como se puede ver en la Fig. 15-2. De esta manera, el portador común en el esquema, el "TF-X", es un portador común, tanto para el K^+ como para el fosfato. La energía que se necesita en este caso sería para la resíntesis del TFA.

En el Cap. 11 se hizo la observación de que los mitocondrios aislados pueden duplicar su formación de TFA para acumular iones como K^+ . Los mitocondrios de riñón aislados también tienen un mecanismo activo para concentrar SO_4^{2-} , Ca^{2+} , y Mg^{2+} contra un gradiente de concentración; este proceso depende de la fosforilación oxidativa. El punto interesante es que la acumulación de SO_4^{2-} por los mitocondrios del riñón es muy similar, en muchos aspectos, a la toma del mismo ion por los cortes de riñón. Uno se pregunta entonces, si no son las membranas mitocondriales más bien que la membrana del plasma las responsables del transporte activo del SO_4^{2-} , y quizás, de otros iones, en éstas y posiblemente, en otras clases de células.

Transporte del azúcar

De un modo semejante, en el caso del transporte del azúcar a través de las membranas, la idea de un portador móvil se ajusta muy bien con la evidencia metabólica y cinética observada. El paso de los azúcares hacia adentro o hacia fuera de las células parece que tiene lugar por medio de dos mecanismos diferentes. Uno está ejemplificado en lo que sucede en las células epiteliales del intestino pequeño y en los túbulos replegados próximos del riñón. Ambas clases de células poseen un proceso dependiente de energía que las capacita para transferir glucosa y algunos otros azúcares íntimamente relacionados, del lumen del intestino o del túbulo del riñón, al torrente sanguíneo en contra de un gradiente de concentración. El otro mecanismo que se ha observado en células tales como los glóbulos rojos de la sangre, las de tumores ascíticos, las musculares, o las del hígado, en las cuales la glucosa puede atravesar las membranas celulares pero no en contra de un gradiente de concentración, no necesita el gasto inmediato de energía. De hecho, este proceso del transporte pasivo, probablemente también tiene lugar en los casos de las células

epiteliales del riñón y del intestino, puesto que la cinética del transporte del azúcar en estos dos casos y en el de los glóbulos rojos de la sangre, se asemejan entre sí. Esta cinética es muy similar a la que se puede aplicar al proceso enzimático, de manera que podemos suponer que en el transporte pasivo está actuando un proceso más complejo que en el de una mera difusión. Se ha observado que tanto el transporte pasivo como el activo, tienen un paso común, que el azúcar penetra a la célula por medio de la combinación con un portador. Este no necesitaría energía e *in toto* debiera ser el proceso de transporte pasivo.

Para explicar la "ascensión" del azúcar contra un gradiente de concentración se ha propuesto el concepto de un portador móvil; se cree que este portador recoge el azúcar de un lado de la membrana, lo lleva consigo al otro lado y luego lo abandona en este lado de la célula. (Fig. 15-5).

Este concepto es más real que teórico porque (1) existe una gran especificidad en la clase de azúcar que puede atravesar la membrana; (2) hay una competencia entre los diversos azúcares para su transporte y por lo tanto, para este portador y (3) la forma como estos azúcares entran en las células, la llamada cinética de la penetración, se acopla bien con la forma como se cumpliría el proceso, si el portador estuviera implicado.

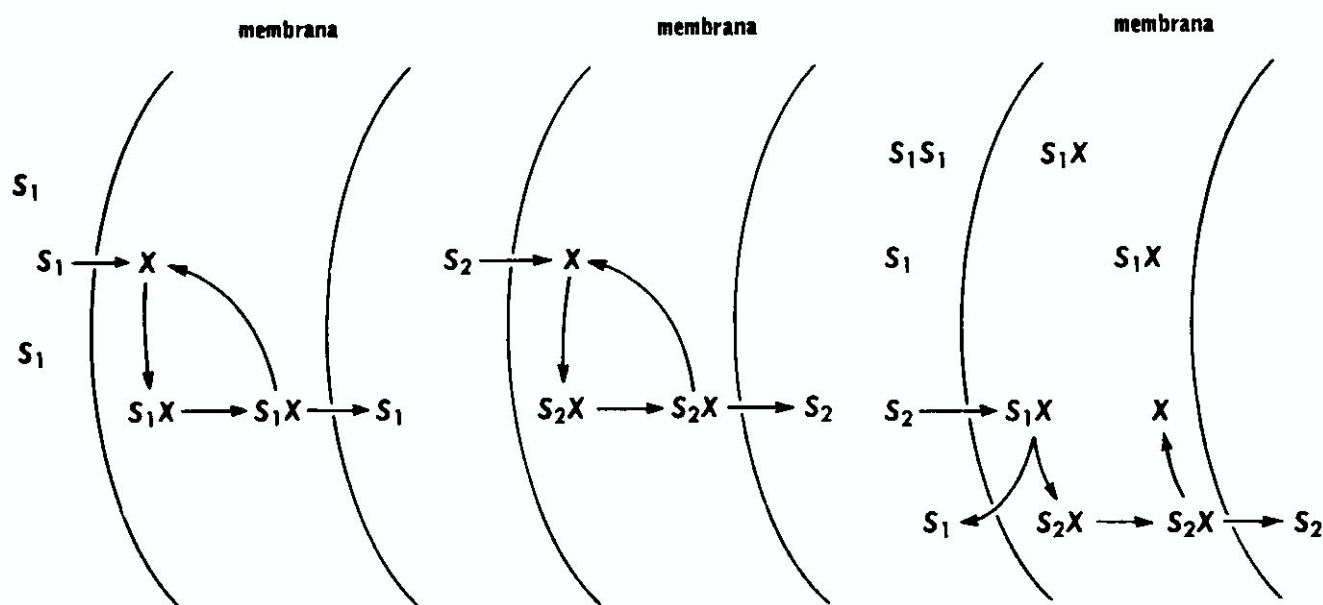


Fig. 15-5. Transporte de azúcar a través de las membranas

Por ejemplo, podemos comparar dos azúcares, el S1 y el S2 (Fig. 15-5) que se combinan con el portador móvil X, siendo trasladados a través de la membrana, como se muestra en la figura. Si uno de los azúcares ya está equilibrado con el portador, formando S1X, y se añade entonces el otro azúcar, S2, el primer azúcar se elimina dentro del medio contra su propio gradiente de concentración.

Este resultado se puede explicar suponiendo que como S2 compite con éxito con S1 por el X y se combina con éste, al mismo tiempo se pone en libertad S1 del X. Conocemos algo acerca de este portador, por las propiedades de los azúcares que logran pasar, por ejemplo, su configuración (D o L) y la forma en que están plegados en estructura tridimensional. Lo que se necesita ahora es encontrar un compuesto o algunos compuestos que tengan las configuraciones estructurales que los hagan acoplarse a las estructuras de los azúcares específicos y también que sean solubles en la estructura lipolítica de la membrana.

Este portador móvil, de alguna forma necesita energía a fin de trabajar, pero no sabemos exactamente el lugar del esquema donde entra esa energía.

TRANSPORTE EN MASA

En la mayor parte de las células, excluyendo las bacterias y algunos hongos, existen membranas intracelulares. En algunos casos estas membranas forman una extensa red intracelular, como se puede observar en las micrografías electrónicas (véase el Cap. 3), en tanto que en otros, las membranas están más bien esparcidas. En algunas células y en algunos casos, cuando el corte del material es favorable, se puede observar claramente la continuidad entre estas membranas intracelulares y la membrana del plasma que rodea a la célula (Fig. 15-6A). En otros cortes se puede ver que estas membranas están también en continuidad con una de las membranas que rodean el núcleo (Fig. 15-6B). Haciendo cortes en serie de tejidos fijados y luego examinando las micrografías electrónicas de estos cortes, los investigadores han encontrado varios puntos clave concernientes a la estructura interna de la célula. Uno es que el sistema de membranas, en las células en que es extenso, divide a la célula en dos compartimientos, uno que queda dentro de las membranas y está rodeado por ellas, y el otro que está afuera. Existe bastante continuidad entre los espacios rodeados por estas membranas. En algunos casos, estos espacios tienen la forma de largos túbulos, en forma de dedos; en otros, tienen la forma de grandes glóbulos; y aún más, en otros, parecen grandes vesículas, aplanadas, llamadas cisternas; pero no importa cuál sea su forma, todos estos espacios parecen estar en continuidad unos con otros. Este sistema de espacios interconectados ha recibido el nombre de retículo endoplasmático (véase el Cap. 13). Los mitocondrios y varias inclusiones celulares, tales como los cuerpos secretorios en algunas células, quedan

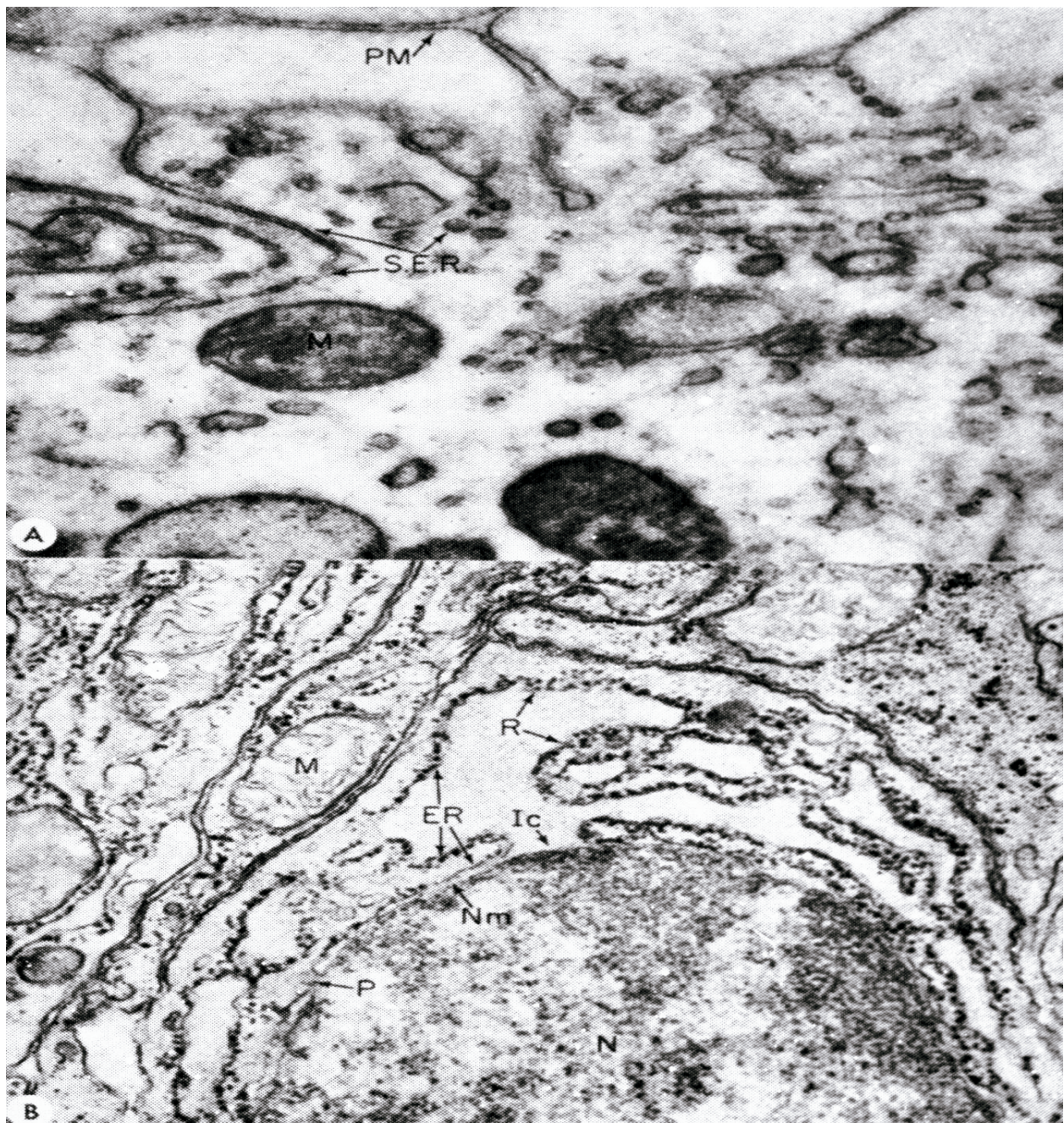


Fig. 15-6. A: Macrófago del bazo, mostrando las penetraciones de la membrana del plasma, en continuidad con las membranas intracelulares (x 37500) B: Célula muscular lisa del intestino, mostrando la continuidad de la membrana nuclear exterior con las membranas del retículo endoplasmático (x 52000). PM, membrana del plasma; M, mitocondrios; N, núcleo; Ic, uniones entre los espacios citoplasmático y perinuclear; P, poro nuclear; Nm, membrana nuclear interior; ER, perfiles del retículo endoplasmático; R, ribosomas; S.E.R. perfiles y cortes longitudinales de las membranas del retículo endoplasmático, que se encuentra en continuidad con la membrana del plasma. (Cortesía de G. Palade, Rockefeller Institute).

fuera de estos espacios. Algunas veces, dentro de ellos se pueden observar cuerpos densos, de función desconocida.

Pero lo más interesante es que el núcleo, con su única membrana que lo rodea, parece estar colocado en un gran espacio ensanchado dentro de estas membranas. Aunque se debe hacer una salvedad, y es que estos elementos membranosos del retículo endoplasmático no encierran completamente al núcleo, de manera que quedan numerosas aberturas o poros sobre la superficie nuclear. Sin embargo, parece ser que estos poros están tapados y por esto debemos suponer que no son aberturas a través de las cuales puedan pasar los materiales entre el núcleo y el citoplasma sino que representan la envoltura incompleta del núcleo por las membranas endoplasmáticas.

Como se ilustra en el diagrama compuesto, estilizado de la Fig. 3-3, la célula no es una entidad autoencerrada en una membrana que la separa del exterior sino una estructura con canales que la comunican con el exterior (quizás sólo intermitentemente), los cuales penetran lo bastante profundo de manera que pueden alcanzar, y algunas veces lo hacen, la región nuclear hasta el espacio perinuclear que rodea al núcleo. Así, la proporción de membrana accesible al medio ambiente está grandemente aumentada y la mayor parte de la célula está en íntimo contacto con el medio ambiente, bloqueada solamente por la cortina activa de una sola membrana. ¿Penetran los materiales del exterior de esta manera? En algunas células tiene lugar un proceso que se ha denominado **pinocitosis**. La membrana celular forma una invaginación, la que se agranda y finalmente se estrecha encerrando dentro de ella un poco del medio ambiente exterior. Esta vesícula se dirige hacia el interior donde se rompe y tal vez deja su contenido en el interior de la célula. El proceso de la pinocitosis se puede observar claramente en la ameba, donde con claridad se verifica en gran escala; este es, probablemente, el medio de que se vale la ameba para tomar su alimento. Las amebas cuando se desarrollan en un medio que contiene glucosa, toman este azúcar dentro de las vesículas pinocíticas; empleando glucosa radiactiva, como lo hizo Holter, podemos determinar por medio de la radioautografía, lo que sucede.

Este proceso parece ser inducido por la presencia de alguna proteína en el medio, porque sin ella, no se verifica la pinocitosis. Una vez dentro de las vesículas de la célula, la glucosa radiactiva aparece en el medio citoplasmático general; seguramente el recubrimiento de las membranas de las vesículas se rompe de alguna forma y pone en libertad la glucosa dentro de la célula.

Sin embargo, no todos los compuestos del medio exterior son tomados, y así debe ser, ya que aun aquí existe una selectividad. Se cree que esto sucede porque hay sitios específicos en la membrana celular donde se fijan algunos compuestos y no otros, y cuando la membrana se invagina, estos compuestos extra-celulares fijados, penetran junto con ella. Un ejemplo interesante es el de la célula endotelial muy delgada que cubre a los capilares sanguíneos (Fig. 3-5B); parece ser que los

materiales son transferidos de la sangre al interior de los espacios intersticiales, literalmente acarreados a través de la célula en pequeñas vesículas; éstas se forman en un lado de las células, viajan a través de la estrecha célula, se fusionan con la membrana del otro lado, y así descargan su contenido fuera de la célula –pero del otro lado. Otro ejemplo es la fabricación y secreción de las enzimas digestivas: quimotripsinógeno, tripsinógeno, amilasa, procarboxipeptidasa y la ribonucleasa, por las células acinares del páncreas. Estas enzimas se sintetizan sobre los ribosomas que se encuentran adheridos a las membranas del retículo endoplasmático. Luego son puestas en libertad de alguna forma de estas partículas, atraviesan las membranas del retículo, y entran a los espacios vesiculares. En estos canales viajan hacia la región de Golgi, en la parte basal de la célula.

Aquí, al parecer, son reunidas para formar grandes y densos cuerpos, los que son envueltos por las membranas de la región de Golgi. Las últimas membranas lisas están en continuidad con las membranas que tienen ribosomas unidos a ellas y por lo tanto, hay un paso continuo de una parte de la célula a la otra.

Estos cuerpos recubiertos son ahora los gránulos de **zimógeno** maduros peculiares de las células acinares pancreáticas. Cuando el páncreas es estimulado para la secreción, los gránulos de zimógeno se dirigen a la parte basal de la célula, la que rodea a uno de los ductos del páncreas. La membrana del gránulo de zimógeno se fusiona entonces con la membrana celular; se hace una fisura en esta última y el contenido enzimático de los gránulos se vierte dentro del lumen glandular, y por medio de los ductos pancreáticos es finalmente descargado en el duodeno.

La Fig. 15-5 muestra algunas etapas de este proceso.

Todos estos casos indican que las membranas intracelulares no son estáticas, que la propia estructura celular, aun de las células fuertemente restringidas de un organismo pluricelular, se encuentra en un estado fluido. Ciertamente, las observaciones efectuadas en las células de cultivos de tejidos muestran muy claramente los movimientos constantes de materiales hasta de cuerpos como los mitocondrios dentro de estas células. En algunas de las células polares, que toman los materiales por un extremo o que los descargan por un lado, se cree que también hay un flujo de membrana, en una sola dirección, de un lado de la célula al otro. La estructura celular no es la de un cuerpo rígido sino la de un flujo que constantemente está cambiando.

Así, además de los procesos de transporte que utilizan sistemas transportadores para acarrear materiales hacia el interior de las células, existe otro mecanismo, el del flujo de la membrana y la formación de vesículas. Probablemente el último proceso necesita energía para contraer y expandir las membranas. Ciertamente puede ser que muchas células utilicen ambas formas para proporcionarse materiales.

El estudiante habrá comprendido, por el anterior razonamiento, que nuestros conocimientos, en lo que se refiere a la mecánica del transporte de materiales, están lejos de ser completos. El problema es el mismo que está implicado para dilucidar la

contracción de los músculos la conversión de la energía química en trabajo mecánico. Hasta que el sistema morfológico completo pueda romperse en sus partes componentes, las preguntas concernientes al movimiento de materiales quedaron sin contestación.

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

Crane, R. K., "Intestinal absorption of sugars", *Physiological Reviews*, Vol. 40 (1960), p. 789.

Finean, J. B., 1961. *Chemical ultrastructure in living tissues*. Springfield, Ill.: Charles C Thomas.

Holter, H., "How things gel into cells", *Scientific American*, September 1961.

— — —, "Pinocytosis", *Annals of New York Academy of Science*, Vol. 78 (1959), p. 524.

Katz, B., "How cells communicate", *Scientific American*, September 1961.

— — —, "The nerve impulse", *Scientific American*, November 1952.

Keynes, R. D., "The nerve impulse and the squid", *Scientific American*, December 1958.

Lefevre, P. G., "Molecular structure factors in competitive inhibition of sugar transport", *Science*, Vol. 130 (1959), p. 104.

— — —, "Active transport through cell membranes", *Protoplasmatologia*, Vol. 8 (1955), No. 7a. (Springer-Verlag, Vienna.)

Palade, E., "Endoplasmic reticulum", *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* Supplement 2 (1956), p. 85.

Porter, E., "Cell membrane and its properties". In Brachet, J., and Mirsky A. E. (eds.), 1961. *The cell*. New York: Academic Press. Vol. 2, p. 1.

Porter, K. R., "The ground substance: observations from electron microscopy". In Brachet, J., and Mirsky A. E. (eds.), 1961. *The cell*. New York: Academic Press. Vol. 2, p. 621.

— — —, "Submicroscopic morphology of protoplasm", *Harvey lectures*, 1955-1956. New York: Academic Press. Page 175.

Robertson, J. D., "Membranes of living cells", *Scientific American*, April, 1962.

Robertson, R. N., "Ion transport and respiration", *Biological Reviews*, Vol. 35 (1960), p. 231.

Solomon A. K., "Pores in the cell membrane", *Scientific American*, December 1960.

Wilmer, E. N., "Steroids and cell surfaces", *Biological Reviews*, Vol. 36 (1961), p. 368.

CAPITULO DIECISEIS

DESARROLLO Y CONTROL DE LA ESTRUCTURA Y FUNCION CELULAR

En los últimos capítulos hemos puesto nuestra atención en el funcionamiento de las unidades individuales que constituyen la maquinaria viviente. Lo maravilloso de la célula es que todos sus procesos están íntimamente correlacionados dentro de un proceso rítmico de crecimiento y división de la célula. ¿Cómo están ligados los millares de procesos tanto en tiempo como en espacio para producir los fenómenos unificados de la vida?

Hasta la fecha conocemos muy pocas respuestas para esta tan importante pregunta, de manera que nos contentaremos en este capítulo, a dirigir nuestra atención a algunas posibles entradas de acercamiento y sugerir la dirección en la cual el trabajo futuro probablemente deba encauzarse. Discutiremos el problema de la regulación desde dos puntos de vista: el enzimático y el estructural.

EL NIVEL ENZIMATICO

El hecho de la coordinación enzimática de la actividad celular se demuestra por la observación de que la célula rara vez sintetiza o descompone más de lo que le es necesario para su metabolismo normal y su crecimiento; se demuestra también por el hallazgo de que la célula es un organismo homeostático; si se le hace algún daño reparable, la célula misma puede arreglarlo.

Aun es posible que al ocurrir determinadas mutaciones en el ADN y que, por lo tanto, no se formen ciertas enzimas, los metabolitos esenciales puedan todavía

producirse, pero en alguna otra forma que no sea la "normal"; éste puede ser el significado de los caminos metabólicos alternos tratados anteriormente.

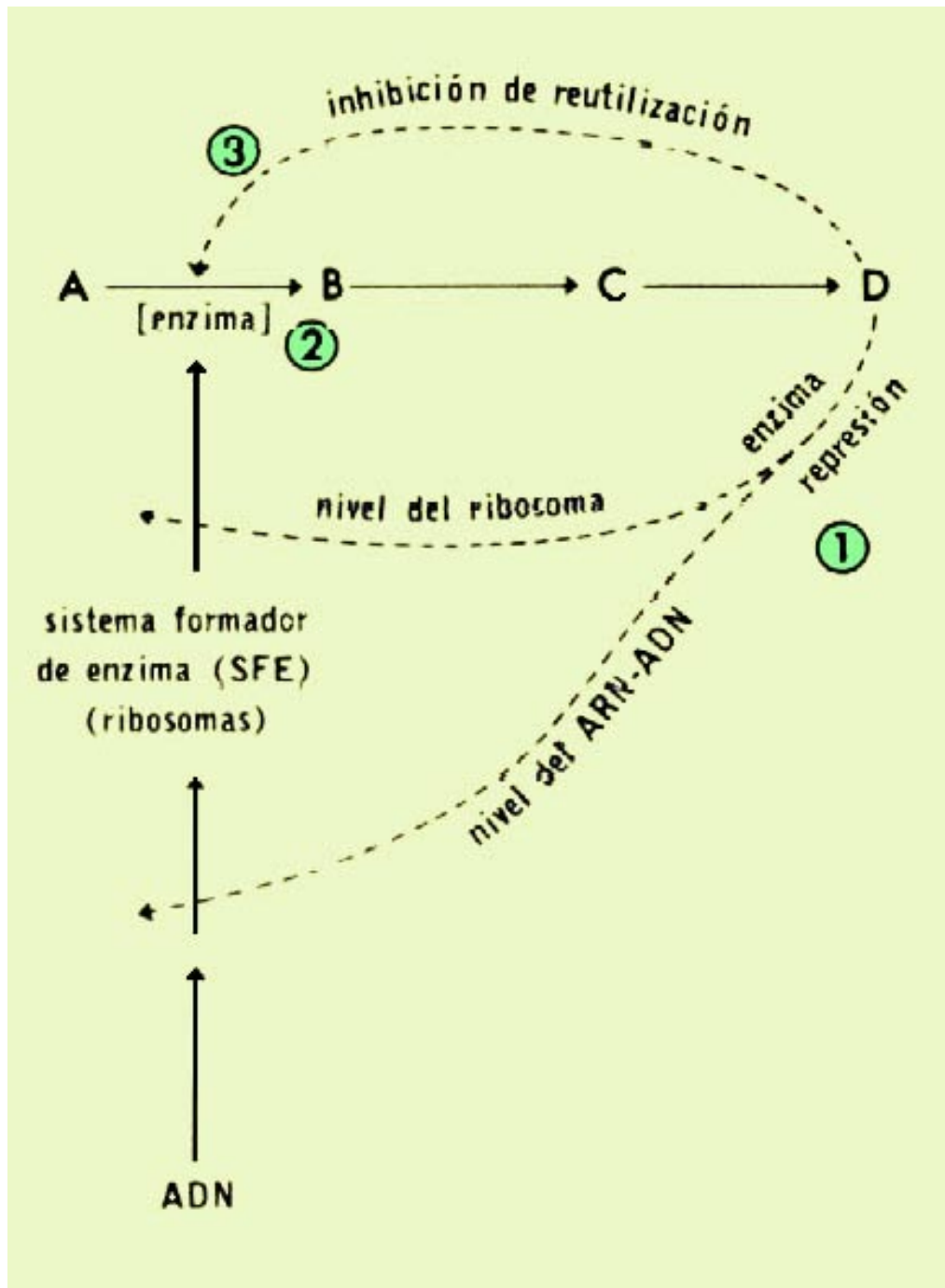


Fig. 16-1. Mecanismos de control de la actividad enzimática.

El control del metabolismo celular se centra alrededor de la regulación del tipo, cantidad y actividad de la enzima; esta última está determinada, en gran parte, por la naturaleza de la misma reacción enzimática. Estas áreas de regulación se pueden trazar, como se muestra en la Fig. 16-1, numerando las de acuerdo:

- (1) control del tipo y cantidad de enzima por los mecanismos que actúan por el gen o ADN y mediante el sistema formador de enzimas;
- (2) control de la actividad enzimática mediante factores que son específicos para una enzima en particular, como el pH, etc. y
- (3) control de la actividad de la enzima por la naturaleza y cantidad del producto que se forma.

Trataremos cada uno de estos casos posteriormente. La velocidad de la reacción está limitada por la cantidad de las moléculas de enzima activas y la cinética de la reacción. La primera, a su vez, está influida directamente por el mecanismo sintetizador de enzimas de la célula, por el ADN, por el ARN y por los tres ribosomas mencionados anteriormente; como también, indirectamente, por las concentraciones de los sustratos y los productos de la reacción enzimática especial. La cinética está influida por las condiciones que prevalecen en el medio de la reacción, por la concentración de los sustratos y por la presencia o ausencia de cofactores, activadores, inhibidores, pH y otros. Trataremos primero el último caso, marcado con los números (2) y (3) en la Fig. 16-1.

Variaciones de la actividad enzimática

Los sustratos y los productos de la actividad enzimática tienen gran influencia en la velocidad de la reacción. Cuando se aumenta la concentración del sustrato, aumenta la actividad enzimática. Si la reacción es reversible, tanto en la práctica como en teoría, el efecto de la acción de masa entra en juego, puesto que el aumento en la concentración del producto tender a disminuir la reacción, ocasionando el equilibrio. En muchos casos, el producto de la reacción inhibe la reacción compitiendo con el sustrato por la superficie activa de la enzima; el grado de esta inhibición depender de la relativa concentración del sustrato y del producto, y de las afinidades relativas de cada uno de éstos por la enzima. De esta manera, a medida que el producto se acumula, la velocidad de su formación disminuye. La mayor parte de las enzimas parecen ser una parte de un conjunto de reacciones lineales, o en secuencia; es decir, el producto de una reacción es el sustrato para la enzima próxima en la serie. En algunos pocos casos, se ha encontrado que en una secuencia de reacciones, $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$, el producto de la reacción $C \rightarrow D$ inhibe la reacción enzimática $A \rightarrow B$. Esto se ha llamado

mecanismo de "reutilización"; cuando D aumenta a cierta concentración, cierra la serie completa de reacciones que conducen a su formación futura. El problema interesante aquí, es que en la mayoría de los casos, el producto $C \rightarrow D$ no tiene semejanza espacial con el sustrato o con el producto implicado en la reacción $A \rightarrow B$; no tenemos idea de cómo compite con un sustrato al que no se asemeja, por un sitio común en una superficie enzimática. Una respuesta posible sería que pueden haber dos sitios en la enzima que afectan su actividad --uno para la combinación con su sustrato y el otro para la combinación con su inhibidor de "reutilización"-- y que la enzima, en el último estado, está inhibida.

La Fig. 16-2 muestra un ejemplo, basado principalmente en las investigaciones de **Magasanik**, de un ciclo sintético en el metabolismo de los nucleótidos, en el que se encontraron varios casos de inhibición enzimática algunos por reutilización de la actividad enzimática y otros por la represión en la formación de la enzima. En este ciclo, el fosfato-5-guanosina puede dar lugar al fosfato-5-adenosina, a través de los intermediarios fosfato-5-inosina y el succinato de adenilo. El fosfato-5-adenosina puede, por supuesto, ser fosforilado a TFA. Este último compuesto actúa entonces para reprimir su propia formación por medio de una inhibición de reutilización sobre la enzima formadora del fosfato-5-inosina a partir del fosfato-5-guanosina. Recíprocamente, el fosfato-5-guanosina puede provenir del fosfato-5-inosina a través del fosfato-5-xantosina. Aquí el FMG inhibe la actividad de la reacción enzimática inicial, la oxidación del fosfato-5-inosina a fosfato-5-xantosina. Asimismo, como se ilustra en la figura, la histidina se sintetiza a través de un paso que implica al fosfato-5-adenosina; aquí de nuevo la histidina inhibe la actividad de la segunda enzima en la serie, retardando efectivamente su propia síntesis. En todos estos casos, parece que cuando el producto final de una serie de reacciones enzimáticas llega a cierta concentración, impide que se continúe su propia formación, inhibiendo la actividad de una de las enzimas, generalmente una de las primeras, en su paso sintético.

Otro punto de control se deriva del hecho de que el mismo compuesto puede servir como sustrato para más de una enzima. Por ejemplo, dos secuencias de reacciones pueden cruzarse en un punto; en este caso, la dirección se puede regular entonces por las velocidades relativas de las reacciones más lentas, las reacciones de "apertura de paso" en cada serie. Cualquier método que pueda acelerar a estas reacciones de apertura de paso, acelerar el paso completo. Si el sustrato tiene una mayor afinidad para unirse a una enzima más que a la otra, esto influir también en la dirección del metabolismo. Porque, si la concentración del sustrato es muy baja, reaccionar solamente con la enzima para la cual tiene una gran afinidad; es decir, la K_m de la reacción es mayor¹.

¹Si se aumenta la concentración el sustrato comenzar a reaccionar con la segunda enzima, donde el K_m es más alto.

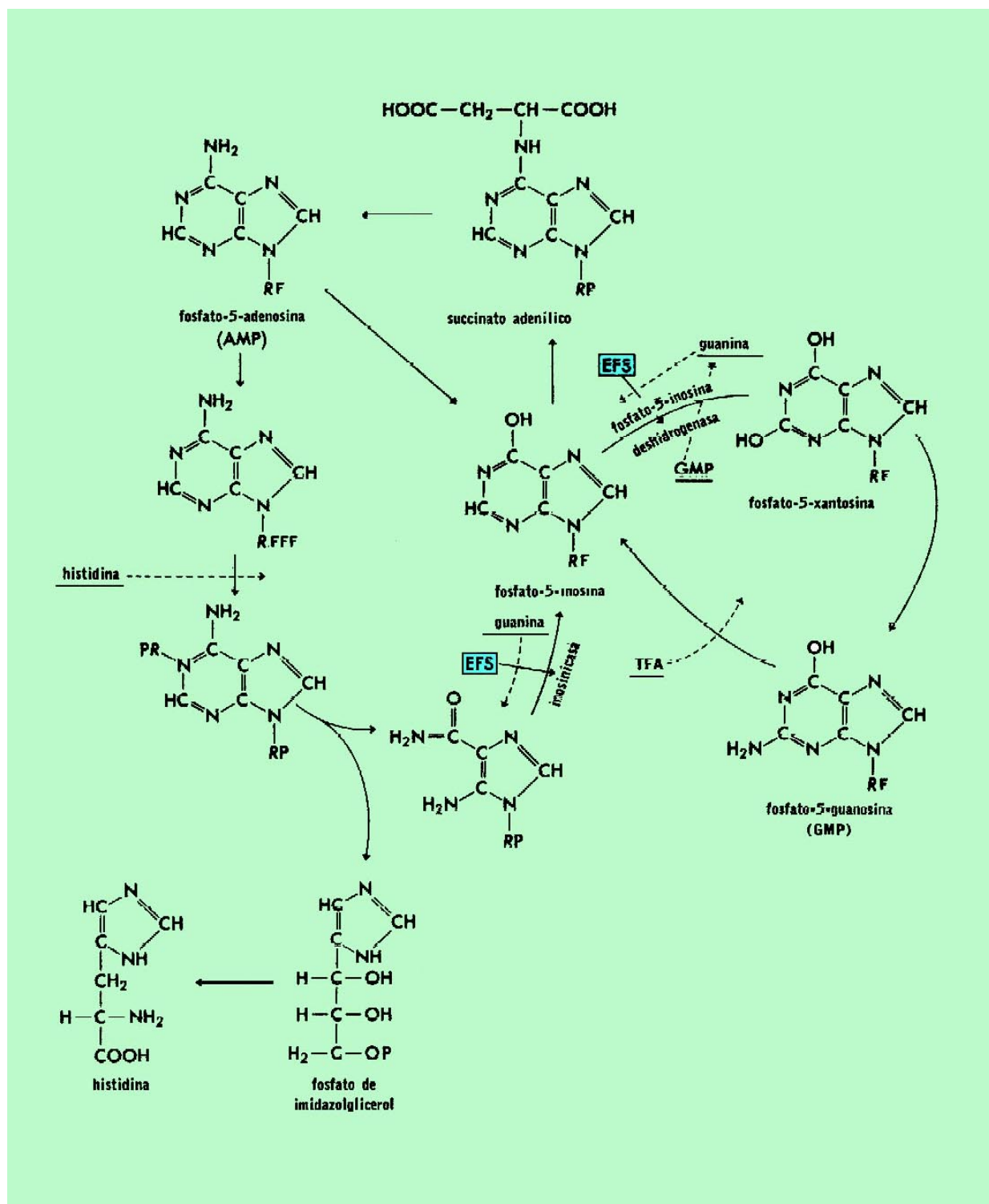


Fig. 16-2 Inhibición de reutilización y represión de la enzima. (Según B. Magasanik, *J. Biol. Chem.*, 235, 1960)

Otra forma de regulación en tal situación fue discutida anteriormente: si el sustrato en cuestión está unido enzimáticamente a un segundo compuesto, y si este compuesto se encuentra en altas concentraciones, el sustrato tenderá a entrar en ese camino de la síntesis. De esta manera la concentración de esta segunda molécula acoplada puede actuar como un medio regulador.

Hay muchas otras formas, demasiado numerosas para mencionarlas aquí, en las que los compuestos solubles de una célula, sean sustratos, coenzimas o iones pueden influir en una reacción enzimática; la mayor parte de estos medios teóricos de regulación han sido observados en los experimentos *in vitro*. Por ejemplo, hemos visto en los Caps. 11 y 14 que el nivel de un cofactor, en ese caso el DFA, puede regular la actividad enzimática. Hay suficientes ejemplos de la misma naturaleza que nos permiten generalizar que la respiración y la fosforilación doble, responden a la necesidad de TFA de célula para la maquinaria sintetizadora. Se ha observado que las coenzimas como el DNA y el DNAF existen en pequeñas cantidades en la célula en relación con el número de reacciones enzimáticas en que participan; estos hallazgos dan lugar a la especulación de que las concentraciones y las condiciones de estos compuestos, ya sean oxidados o reducidos, pueden determinar la dirección de un paso metabólico en el caso de estos pasos alternativos. Por ejemplo, en la síntesis de los ácidos grasos y esteroides, hay necesidad de un DNA y de un DNAF reducidos; el estado de reducción de estas coenzimas puede muy bien influir el destino de la grasa en la célula, si ser oxidada para producir energía o si seguir su transformación para dar lugar a ácidos grasos superiores. Por supuesto, el estado de reducción de estas coenzimas depender de las velocidades relativas de reducción y oxidación por las deshidrogenasas de la célula.

De esta manera creemos que la condición del medio en el cual actúa la enzima, determina, en gran parte, la velocidad de su actividad y no cabe duda que la célula emplea muchos de los medios bosquejados anteriormente para regular la actividad enzimática. Debe también tenerse en cuenta, sin embargo, que muchas enzimas no son solubles en las células; están rodeadas por estructuras y sus actividades están influidas por éstas. Por ejemplo, cualquier aflojamiento, cualquier cambio en la forma en que la enzima está unida a una membrana, influir en su actividad. Inversamente, el hecho de que algunas enzimas estén en ciertas estructuras dentro de la célula significa que sus sustratos no pueden tener libre acceso a ellas. Un sustrato puede ser atacado por una enzima de preferencia que por otra, no debido a ciertas propiedades intrínsecas de los complejos respectivos enzima-sustrato sino simplemente a causa de que tiene más fácil el acceso a la primera enzima. Ciertamente, esta propiedad ha sido postulada por algunos autores tomando en

consideración el efecto Pasteur; este efecto es que, en condiciones aerobias se inhibe la glicólisis de la glucosa a ácido láctico.

Al presente, la clave de lo que es sin duda un importante mecanismo regulador celular, este efecto Pasteur, es buscada generalmente pero hasta ahora, sin éxito entre los procesos fosforilativos glicólicos y oxidativos. Se ha pensado, durante mucho tiempo, que puesto que la glucosa debe ser fosforilada por el TFA y la hexoquinasa con el fin de colocarla en el camino glicolítico, el punto de regulación del efecto Pasteur debe estar en esta reacción de la hexoquinasa. Puede ser que durante las oxidaciones aerobias, los mitocondrios utilicen todo el fosfato inorgánico disponible de la célula, dejando muy poco para la fabricación glicolítica del TFA para ser utilizado por la hexoquinasa. Si, al mismo tiempo, el TFA fabricado en los mitocondrios tiene dificultad de ser liberado por ellas, la glicólisis se reducir debido a la escasez de estos cofactores. Sin embargo, la fosforilación de la glucosa es solamente el paso inicial en la glicólisis y no puede ser el limitado. De esta manera, mientras se ha visto que la carencia de fosfato o de DFA, no inhibe la fosforilación de la glucosa o la absorción de ésta por la célula, en cambio produce un bloqueo en la formación del ácido láctico a partir de la glucosa. Ciertamente, parece también inverosímil que los mitocondrios al utilizar fosfato inorgánico o DFA en la fosforilación oxidativa, puedan conservar un nivel intracelular tan bajo como para perjudicar la utilización de la glucosa o la fosforilación y formación de ácido láctico. En la actualidad, a pesar de la gran cantidad de investigaciones, el efecto Pasteur, todavía se encuentra sin explicación. Parece dudoso que los niveles de fosfato inorgánico o de DFA, aun si éstos están compartidos entre los mitocondrios y el resto de la célula, puedan explicar por si solos el efecto. Igual duda puede expresarse acerca de la competencia entre las enzimas glicolíticas y las oxidativas por aquellas coenzimas comunes a ambas, como el DNA o el DNAF.

Variaciones de la cantidad enzimática

Además de los mecanismos asociados con la regulación de la actividad enzimática, existe otra forma de coordinación del metabolismo en la célula que está relacionado con la regulación de la cantidad enzimática (marcada con el (1) en la Fig. 16-1). Se ha descubierto en los microorganismos, habiendo muy pocos casos reportados para células de organismos pluricelulares, un fenómeno llamado de inducción y represión enzimática; ambos tienen que ver con el control de la síntesis de las enzimas. Por ejemplo, en las bacterias, las concentraciones de algunas enzimas dependen, extraordinariamente, de las condiciones de crecimiento, de la composición del medio. Se ha encontrado, en muchos casos, que **la adición de un sustrato puede inducir a la maquinaria sintetizadora de proteínas de las**

bacterias, a sintetizar muchas moléculas de la enzima que ataca este sustrato en particular. Cuando el sustrato es metabolizado y desaparece, cesa la síntesis de esta enzima. Se ha postulado sobre esta base, que en una serie lineal de reacciones enzimáticas, el producto de la enzima₁, que es el sustrato de la enzima₂, puede inducir la síntesis de ésta, y así sucesivamente. Aun se ha supuesto que este mecanismo puede explicar la formación de nuevas enzimas en las primeras etapas del desarrollo embriológico.

En la situación inversa, **algunos compuestos pueden provocar una represión en la formación de enzimas.** Este efecto represivo puede ser inducido por el producto de la enzima en cuestión. En algunos casos de una serie lineal de reacciones enzimáticas, el producto de la enzimas puede causar la represión en la formación de la enzimas. La Fig. 16-2 muestra dos ejemplos de este efecto represor. La guanina puede actuar en dos sitios para suprimir la formación del fosfato-5-guanosina: uno, para eliminar la formación de la enzima inosinicasa, enzima que está implicada en la síntesis del fosfato-5-adenosina; y dos, para inhibir la síntesis de la enzima deshidrogenasa del fosfato-5-inosina, la que se encuentra en el camino de la formación del fosfato-5-guanosina.

Tanto en el caso de la inducción como en el de la represión enzimática, las moléculas de poco peso molecular no reaccionan para aumentar o inhibir la actividad enzimática, pero actúan en el sitio genético que tiene injerencia en la síntesis de esa determinada proteína. Existen algunas pruebas procedentes de estudios genéticos bioquímicos de que, en las células bacterianas que pueden producir enzimas inducibles, el gen que controla la formación de esta enzima está compuesto de material genético que codifica la síntesis de esa proteína, como también de un gen represor, y que este último inhibe la expresión del primero. Se supone que al añadir un inductor, éste se combina con el gen represor, permitiendo de esta manera el funcionamiento del otro gen. Se considera que la represión de la enzima funciona en una forma similar.

Las enzimas y la estructura celular

En resumen, estamos empezando a comprender cómo la concentración de moléculas pequeñas dentro de la célula puede controlar sus actividades enzimáticas. La formación de intermediarios tiene lugar en una serie de reacciones metabólicas. En esta serie, la velocidad de la reacción completa depende de la velocidad de la más lenta, y esta velocidad a su vez, depende de la cinética de la interacción enzima-sustrato. Si este sustrato es también común a otro camino metabólico, debe haber algún medio para controlar la dirección del trayecto metabólico.

Este control puede verificarse si el producto del camino metabólico actúa como un inhibidor del camino alternativo o por inhibición de reutilización, o reprimiendo la formación de la enzima, que ataca primero al sustrato en cuestión a lo largo de ese camino. Por lo tanto, está claro que el producto de las reacciones enzimáticas tiene mucho que ver con la velocidad de su propia formación y con la velocidad de las reacciones. Por supuesto, la forma cómo estos productos están divididos dentro de la célula tiene un efecto restrictivo sobre estas interacciones. Si un producto se mueve dentro de una parte diferente de la célula, significa que ha salido de la esfera de la enzima que se supone está influida por él. En el caso de la célula bacteriana, en la que no existe evidencia de membranas internas, esto no representa una complicación. En otras células, sin embargo, es casi una verdad que lo que se ha observado en las bacterias, referente a inhibiciones en la formación y en la actividad de las enzimas, tiene variaciones por el hecho de que existen diferencias de concentración del mismo compuesto en las diferentes partes de la célula. Esta concentración de los compuestos libres está regida, no solamente por las barreras de las membranas intracelulares, sino por la probabilidad de que muchos de estos compuestos están ligados a otras moléculas no covalentemente, aun a las membranas. Lo que nosotros consideramos como compuestos libremente accesibles a las enzimas puede ser que no lo sean realmente dentro del marco estructural de la célula. Sabemos, por ejemplo, que el DNAH se forma durante la glicólisis. También sabemos que este DNAH puede ser empleado por la célula para producir energía en la producción del TFA. No se conoce precisamente cómo el DNAH se utiliza, pero nuestra observación frecuente es que de alguna manera penetra dentro de los mitocondrios, allí es oxidado por medio de la cadena transportadora de electrones y así produce los equivalentes de energía bajo la forma de fosfatos de elevada energía. Pero no tenemos ninguna indicación de cómo, ni de si el DNA. consigue penetrar dentro de los mitocondrios. Parece ser que de alguna manera la membrana mitocondrial tiene una influencia reguladora sobre el metabolismo de la coenzima y concomitantemente, sobre el metabolismo de la energía.

El verdadero hecho de que las enzimas individuales y aun los ciclos metabólicos completos estén en compartimientos dentro de la célula indica fuertemente que la estructura interna de ella está condicionada para una regulación sencilla por su misma configuración. En una solución podemos medir las diferencias de afinidad entre el propio sustrato y las diversas enzimas que actúan sobre él, y entre la misma enzima reaccionando sobre sustratos que varían ligeramente. Estas afinidades, sin embargo, pueden no tener significación dentro de la célula dividida. Los bioquímicos han trazado los lugares dentro de la célula donde tienen lugar la mayor parte de los pasos enzimáticos individuales, pero no se sabe cómo estos pasos se unen en una célula que funciona fácilmente. Aún el más fundamental de estos pasos ha escapado a nuestros experimentos interpretativos especialmente, cómo el piruvato procedente de la glicólisis en la matriz soluble de la célula,

penetra en los mitocondrios para ser oxidado. Por lo tanto, el descubrimiento de los citólogos de la maravillosa arquitectura interior de la célula, ha abierto para los fisiólogos y para los bioquímicos, nuevos campos para futuras investigaciones.

EL NIVEL ARQUITECTONICO

Hemos sugerido que la diversidad arquitectónica de la célula debe desempeñar un papel en el control y regulación de las muchas y diversas reacciones bioquímicas que tienen lugar simultáneamente en la célula. Ahora la pregunta lógica es la siguiente: ¿Cómo es elaborado el complejo arquitectónico de la célula? O más específicamente, "¿Cómo es fabricada la membrana? ¿Cómo se organiza un cilio? ¿Cómo se dispone el huso? ". Aunque no podemos contestar a estas preguntas, comenzamos a hacer algunos progresos mediante los sistemas "modelos" sencillos.

En la coagulación de la sangre, por ejemplo, sabemos que una enzima (trombina) puede actuar sobre una proteína soluble (fibrinógeno) y separar dos péptidos cortos. Esta acción modifica las moléculas del fibrinógeno de tal manera, que origina que reaccionen específicamente entre si para formar una malla de fibras altamente organizada (Fig. 16-3) que constituyen el coágulo de sangre (fibrina). Esta interacción específica tiene lugar a pesar de la presencia de muchos otros tipos de moléculas de proteínas en el plasma de la sangre. La malla de fibrina parece estar sostenida por fuerzas secundarias débiles puesto que se puede disolver fácilmente en diversos disolventes suaves (ácido acético al 2%). Una segunda enzima (fibrinasa)

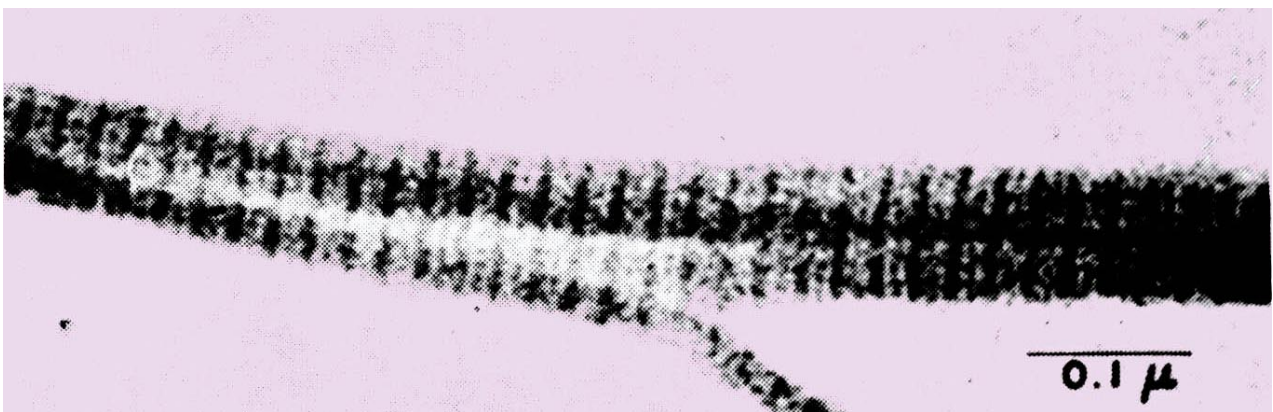


Fig. 16-3. Microfotografía electrónica de un segmento de fibra de fibrina teñida con ácido fosfotúngstico (x148800). Cortesía de C.E. Hall y H.S. Slayter, Massachusetts Institute of Technology)

puede hacer a la malla de fibrina insoluble en gran variedad de disolventes y podemos sacar en conclusión que entonces está unida por medio de enlaces covalentes. No comprendemos hasta ahora los detalles moleculares de la última reacción.

El sistema que hemos descrito es relativamente sencillo. No obstante, es un modelo interesante para el estudio de las series de reacciones controladas enzimáticamente que resultan al formarse una estructura fibrilar organizada. Uno puede predecir también que la célula es capaz de utilizar *enzimas específicas* para reaccionar con proteínas estructurales específicas, modificándolas de tal manera, como para que interaccionen específicamente y originen estructuras peculiares.

Se han estudiado activamente varios otros sistemas de interacción de proteínas. En el campo de la inmunología, la interacción altamente selectiva entre los antígenos y los anticuerpos está proporcionando mucha información para el conocimiento detallado de la naturaleza de las fuerzas moleculares implicadas en la interacción proteína-proteína y proteína-carbohidrato. Estas y otras investigaciones han conducido a la hipótesis general de que la interacción entre las macromoléculas se debe a la "complementariedad" de sus superficies respectivas, que encajan entre sí como una llave en la cerradura.

Quizás la investigación más espectacular sobre la morfogénesis de la estructura fina es la efectuada con el virus del mosaico del tabaco y se remite al estudiante al excelente libro y artículo de **Fraenkel-Conrat** (véase la Lista de Lecturas que se sugieren al final de este capítulo). Estos estudios muestran que las necesidades para la formación de un virus de arquitectura compleja están cimentadas en las propiedades de las sub-unidades individuales, en este caso, en las 2200 subunidades de proteína y la larga cadena de ARN (Fig. 16-4). De esta manera creemos que el plegamiento (estructura secundaria y terciaria) de la subunidad de proteína es tal que es capaz de interactuar consigo misma y con el ARN para formar una partícula de virus de diseño sumamente regular y preciso.

Queda por verse si todas las estructuras de las células son igualmente capaces de formarse *de novo* precisamente a partir de sus macromoléculas componentes. Recientes investigaciones de **Sonneborn** sobre la herencia de la capa externa o *córtex del Paramecium*, indican que la presencia de ciertas características estructurales en la capa externa se perpetúan de generación en generación, independientemente de la naturaleza específica del material genético y del resto del citoplasma. Parece ser que la capa cortical es instrumental en la formación de más capa cortical. La autorreproducción de los cromosomas, por supuesto, un fenómeno establecido y tenemos razón al creer que otras estructuras celulares como los centríolos y los cloroplastos y posiblemente hasta los mitocondrios, son también autoduplicativos.

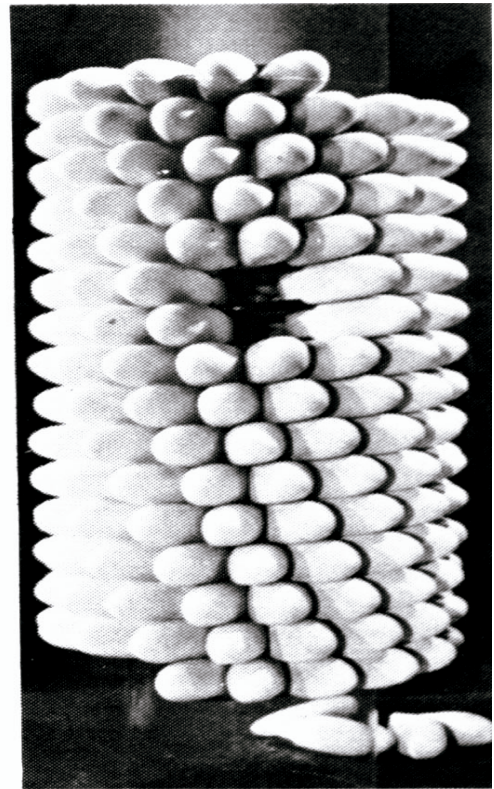
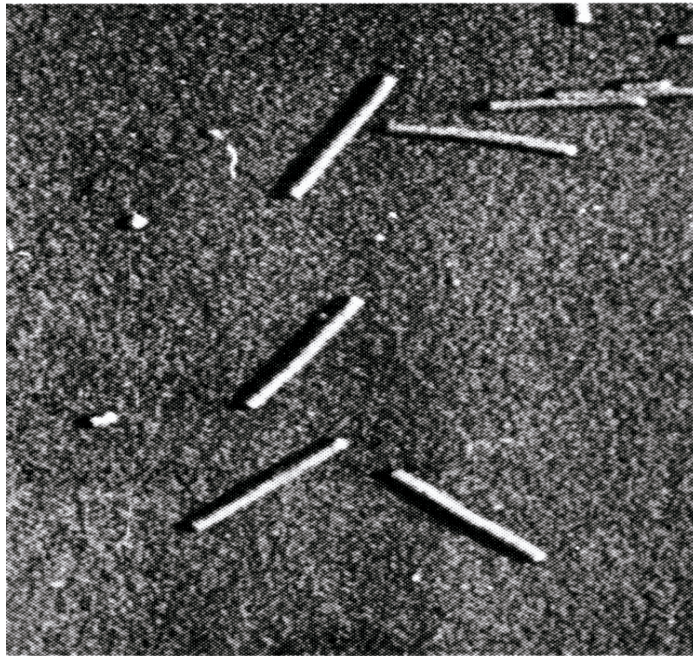


Fig. 16-4. A: Micrografía electrónica del virus del mosaico del tabaco (x 60000). Los bastoncitos (15 x 300Å) están compuestos de 95% de proteínas y de 5% de ARN. El peso molecular es aproximadamente de 40 millones. B: Modelo de Caspar-Klug del virus del mosaico del tabaco. La espiral interior (negra) es la cadena del ácido nucleico enrollándose en una hélice plana. Alrededor de ella, en ángulos convenientes se encuentran las subunidades de proteínas (sólidos blancos de forma elipsoidal) que constituyen la "capa" del bastoncito del virus. (Fotografías cortesía de Wendell M. Stanley Virus Laboratory University of California)

Es así cómo para las estructuras más complejas de la célula, es necesaria alguna estructura para el desarrollo de más estructura.

Sea cual fuere el mecanismo de la autoduplicación del organulo celular, creemos que se probar que depende de la especificidad de la interacción entre las macromoléculas. Lo que nosotros encaramos es un proceso por el cual determinado organulo celular se desarrolla, seleccionando la macromolécula apropiada en su medio ambiente. No se excluye por supuesto el papel de las enzimas en preparar a estas macromoléculas estructurales para su función particular. Así parece que la célula tiene dos tipos completos diferentes de herencia: primero, a través del ADN, que es el responsable esencial de la estructura tridimensional de las enzimas o de las proteínas estructurales; y segundo, a través de determinadas estructuras celulares autorreproductivas que se perpetúan a si mismas seleccionando de su medio ambiente algunas de las enzimas y proteínas estructurales producidas por el ADN.

Si atribuimos a las estructuras tridimensionales de las proteínas un papel más importante en el mecanismo que elabora la arquitectura celular, entonces, ¿cuál es el mecanismo que forma las estructuras secundaria y terciaria? Nos hemos referido brevemente a este problema en el Cap. 13 y el espacio no nos permite discutirlo en detalle. Baste decir que las investigaciones efectuadas sobre la ribonucleasa y otras proteínas dan idea que la secuencia de los aminoácidos en el péptido (estructura primaria) determina, por lo menos en parte, la definitiva configuración tridimensional propia y verdadera de la proteína.

Existe la posibilidad de que otras condiciones de la célula puedan desempeñar también un papel de guía. Por ejemplo, Dintzis ha demostrado que la hemoglobina es sintetizada ordenadamente partiendo del N terminal de los ribosomas de los reticulocitos del conejo. Esto puede significar que el polipéptido también es "desmembrado" con determinada secuencia, posiblemente al ser abandonado por un polipéptido de reciente formación. Si esto es así, debe haber un factor "cinético" que guíe el plegamiento hacia una determinada configuración final. La última forma puede ser una configuración estable, pero no es la única; los llamados estados "desnaturalizados" pueden representar otras configuraciones estables para determinada proteína.

Todavía nos falta saber cómo las proteínas fabricadas de dos o más cadenas diferentes de polipéptidos se ensamblan en la célula. ¿Están hechas en los mismos o en diferentes ribosomas? Y si fuera como en el último caso, ¿cómo se unen las cadenas separadas de polipéptidos para formar la molécula completa de proteína?

Conocemos que la célula almacena su mensaje genético en forma de ADN, un sistema que emplea un lenguaje lineal, sencillo, basado en cuatro variables. Los mensajes en este lenguaje se traducen en el lenguaje más rico de las proteínas, basado aproximadamente en 20 variables pero todavía organizado en forma lineal. Este nuevo lenguaje, con su grandísima variedad química es la base para una serie de transformaciones espaciales que dan por resultado la formación de una estructura tridimensional altamente específica con nuevas y especiales propiedades químicas. Así nació la molécula de proteína "nativa" –ya sea ésta una enzima o una proteína estructural– y es capaz de interactuar específicamente con otras proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y otras moléculas orgánicas para formar ambas, la maquinaria estructural y la metabólica de la célula.

Cómo funciona esta maquinaria en la regulación y control celulares, ser contestada con más y más precisión en un futuro próximo, posiblemente por algunos de los lectores de este libro.

LISTA DE LECTURAS QUE SE SUGIEREN

Allen, J. M. (ed.), 1962. *Molecular control of cellular activity*. New York: McGrawHill.

Bonner, D. M. (ed.), 1961. *Control mechanisms in cellular processes*. New York: Ronald Press.

Finean, J. B., 1960. *Chemical ultrastructure in living tissues*. Springfield, Ill.: Charles C Thomas.

Fraenkel-Conrat, H., 1962. *Design and function at the threshold of life: the viruses*. New York: Academic Press.

———, "Rebuilding a virus," *Scientific American*, June 1961.

Gross, J., "Collagen," *Scientific American*, May 1961.

Oncley J. L. (ed), 1959. *Biophysical science: a study program*. New York: Wiley.

Pauling, L., and **Itano, H. A.**, 1957. *Molecular structure and biological specificity*. Institute of Biological Sciences.

Potter, V. R., and Heidelberger, C., "Alternative metabolic pathways," *Physiological Reviews*, Vol. 30 (1950), p. 487.

Schmitt, F. O., "Giant molecules in cells and tissues," *Scientific American*, May 1961.

Wolstenholme, G. E. W., and O'Connor, C. M. (eds.), 1959. *Regulation of cell metabolism; Gilda foundation symposium*. London: J. and A. Churchill.

RESUMEN

Hemos intentado presentar al principiante, en este pequeño volumen, la *descripción funcional* de la célula, su estructura dinámica, sus capacidades sintetizadoras, sus propiedades de autoduplicación y sus interacciones con el medio ambiente. Hemos omitido muchos detalles íntimos de la estructura celular, de la actividad bioquímica y del comportamiento fisiológico. Nos hemos refrenado también de especular bastante acerca de la periferia de nuestros conocimientos donde los hechos y la fantasía están en un rápido flujo. Hemos mostrado que, a pesar de los ricos detalles de nuestro conocimiento en lo que se refiere a la maquinaria molecular de la célula, estamos todavía virtualmente ignorantes del mecanismo molecular por el cual se regula la gran cantidad de sus reacciones. Estamos más ignorantes aún acerca de un aspecto crucial de la regulación celular, que es el mecanismo por el cual la célula trata de introducirse en un camino particular de diferenciación. El misterio de este mecanismo por el cual las células con el mismo fondo hereditario se desarrollan en tipos de células adultas completamente diferentes, está aún sin violarse. Aún más, esta cuestión está comenzando a ocupar la atención de los biólogos citólogos, y se espera un rápido progreso en el futuro.

Nuestro optimismo se basa en las increíbles hazañas poderosas de los últimos años. Estamos en el umbral de la mayor revolución en la historia de la humanidad, que es la comprensión de la naturaleza de la Vida misma. No existe un objetivo más grande de admiración, ninguna cosa de belleza más inmensa que el orden dinámico, la complejidad organizada de la vida. Estamos siendo testigos quizás, del evento más dramático en la lenta evolución de la vida —el cerebro humano se examina a sí mismo y a sus orígenes ¡la vida volviéndose a la vida! Nosotros, que somos Naturaleza, estamos evolucionando para conocer a la Naturaleza.

*—Todo lo que vive es hermoso,
La Vida se deleita en la Vida.*

BLAKE